



**Marisa Alexandra Freire de Castro**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

**Estudo da Influência Das Matérias-Primas e Variáveis  
Processuais Na Concentração Final de 3-MPCD em  
Bolos *Luxury***

Orientador: Eng<sup>a</sup> Lúcia Rodrigues DanCake Portugal SA.

Co-orientador: Prof. Mário Eusébio, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Doutor Eduardo Emanuel Hipólito Pires Mateus

Vogais: Doutor Eduardo Emanuel Hipólito Pires Mateus  
Eng<sup>a</sup> Lúcia Maria Costa Rodrigues Pinto



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2017**



**Marisa Alexandra Freire de Castro**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

**Estudo da Influência Das Matérias-Primas e Variáveis  
Processuais Na Concentração Final de 3-MPCD em  
Bolos *Luxury***

Orientador: Eng<sup>a</sup> Lúcia Rodrigues DanCake Portugal SA.

Co-orientador: Prof. Mário Eusébio, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Doutor Eduardo Emanuel Hipólito Pires Mateus

Vogais: Doutor Eduardo Emanuel Hipólito Pires Mateus  
Eng<sup>a</sup> Lúcia Maria Costa Rodrigues Pinto

**2017**





Estudo da Influência Das Matérias-Primas e Variáveis Processuais Na Concentração Final de 3-MPCD em Bolos *Luxury*

Copyright © Marisa Alexandra Freire de Castro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## AGRADECIMENTOS

---

Nesta página vou citar os nomes das pessoas que contribuíram de alguma maneira, directa ou indirectamente, para que esta dissertação fosse realizada.

Primeiramente gostaria de agradecer à DanCake Portugal SA e a toda a equipa que integra, por me ter recebido e por ter demonstrado todo o interesse no meu trabalho.

Queria também agradecer à Daniela, à directora de recursos humanos da DanCake, que tornou toda esta experiência possível e me contagiou de energia positiva. Devo também um grande agradecimento à minha orientadora de estágio Lúcia Rodrigues, que se demonstrou sempre disponível para me auxiliar e na qual senti sempre um ombro amigo.

Não poderia deixar de referir o meu apreço pela ajuda do meu Co-Orientador Prof. Mário Eusébio, que desde do primeiro dia me prestou auxílio e disponibilidade para tudo o que fosse necessário.

Deixo também um grande agradecimento ao Prof. Marco Silva e ao Davide Mendes, que me acompanharam na fase final desta dissertação e que tornaram o desenvolvimento experimental da mesma possível.

Queria também deixar um agradecimento à D<sup>a</sup>. Palminha do laboratório, que esteve sempre disponível para me auxiliar durante as análises laboratoriais.

Às minhas colegas da DanCake: Maria Santos, Rosa Vilas-Boas, Ana Sarmento, Joana Monteiro, Paula Ascenso, Vanda Araújo, Susana Lemos e Sofia Oliveira que me acompanharam durante todos estes 6 meses e que em conjunto, partilhámos momentos que certamente guardaremos para a vida, fica aqui o meu agradecimento por terem de certa forma, contribuído para que o desenvolvimento desta dissertação tivesse outro gosto. E aproveito para dizer que: *“O que a DanCake uniu, jamais irá separar”*.

O agradecimento eterno, à qual estas palavras não chegam para descrever, é o que tenho a dever aos meus pais, que sempre me apoiaram e me desenharam à sua imagem. Orgulho-me de dizer que nunca fizeram questão de me entregar o “peixe”, mas sempre me deram uma “cana para pescar”, e assim me tornei o que sou hoje.

Aproveito também, para agradecer ao meu mais que tudo, à pessoa que me acompanha desde sempre, que me ouviu quando eu mais precisei de falar, que me aconselhou quando eu mais precisava de ouvir, e que festejou comigo os momentos mais emocionantes. Certamente iremos colher os frutos deste grande pomar juntos.

Quero também agradecer aos meus parceiros e *compatriotas* de curso, Daniela Gaspar, Ana Ventura, Pedro Melo e Solange Marques, que desde do primeiro ano de curso, partilhámos experiências que certamente ficarão para vida.

Depois de tudo isto, resta-me dizer que todo este percurso me proporcionou uma grande aprendizagem da qual resultou não só um grande enriquecimento do meu currículo, mas também do meu coração.



## RESUMO

---

O 3-monocloropropano-1,2-diol é um contaminante alimentar que faz parte da classe dos Cloropropanóis e está presente em muitos alimentos e ingredientes alimentares. Encontrando-se ao abrigo do Regulamento (EC) 1831/2006, a exposição ao 3-MCPD tem valores estabelecidos recomendados conforme a legislação em vigor estabelecida pela EFSA a nível da UE, tendo sido em 2013, considerado como possível carcinogénico humano pela IARC.

A Alemanha é um dos países da Europa que tem demonstrado mais interesse no controlo deste tipo de contaminantes e, devido a esse factor existe uma maior incidência no estudo, detecção e minimização do mesmo por parte desta potência europeia.

No caso em estudo pretende-se averiguar meios de redução do 3-MCPD nos bolos *luxury* produzidos pela DanCake. A redução deste composto é uma temática que requer urgência, já que 70% da produção da empresa tem como destino a exportação, e o cliente em questão exige níveis máximos de concentração deste contaminante inferiores a 240 ppb. (0.240 mg/kg).

A solução passa, portanto, por averiguar quais as variáveis que possam estar na origem do aumento do nível do 3-MCPD quer a nível processual, quer a nível de produto e matérias-primas associadas. Todo este estudo implica a análise das várias receitas antecipadamente desenvolvidas com base num estudo prévio das variáveis que possivelmente podem ter influência na concentração de 3-MCPD.

Foi desenvolvida uma tentativa de implementação de um método analítico por GC/MS, sem derivatização, porém, esta tentativa resultou numa baixa sensibilidade do método. Não sendo possível quantificar o 3-MPCD sem recorrer ao passo de derivatização, testaram-se posteriormente dois tipos de agentes derivatizantes, o HFBA e o BSTFA, tendo o BSTFA apresentado melhores resultados.

Este método foi usado para quantificar a concentração de 3-MCPD em 46 amostras de bolo preparadas em laboratório, nas matérias-primas e produtos/água de limpeza intermédios do processo.

Da análise ao processo e de acordo com as referências bibliográficas, concluiu-se que há um potencial de contaminação através das matérias-primas que contêm óleo de palma na sua constituição quer directamente quer indirectamente, da qual se destaca o óleo desmoldante. Esta relação não é directa e as condições processuais têm influência na degradação do 3-MCPD. No entanto da análise dos resultados obtidos não foi possível constatar esta relação directa. Estes resultados preliminares mostram a necessidade de efectuar mais estudos de validação do processo de extracção e do método GC/MS, bem como proceder à realização de mais ensaios à escala piloto e à escala industrial, nomeadamente estudos cinéticos de degradação e formação do 3-mcpd, quer na sua forma livre quer nas diversas formas esterificadas.

---

### Palavras-chave:

3-MCPD, Contaminantes, Cloropropanóis, Óleo De Palma, Óleos e Gorduras, Derivatização



## ABSTRACT

---

3-monoclopropane-1,2-diol is a food contaminant that is part of the class of Chloropropanols and is present in many foods and food ingredients. Under Regulation (EC) 1831/2003, exposure to 3-MCPD has established values recommended under current legislation established by the EFSA at EU level, and was considered as a possible human carcinogen by the IARC in 2013.

Germany is one of the countries in Europe that has shown more interest in the control of this type of contaminants and because of this factor there is a greater incidence in the study, detection and minimization of the same by this European power.

In the case under study it is intended to investigate ways of reducing 3-MCPD in the luxury cakes produced by DanCake. The reduction of this compound is a matter that requires urgency, since 70% of the company's production is destined for export, and the customer in question requires maximum concentration levels of this contaminant of less than 240 ppb. (0.240 mg / kg).

The solution is therefore to investigate the variables that may be at the origin of the increase in the level of 3-MCPD, both at the procedural level and at the level of associated products and raw materials. All this study involves the analysis of the various recipes developed in advance, based on a previous study of the variables that may possibly influence the concentration of 3-MCPD.

An attempt was made to implement an analytical method by GC / MS, without derivatization, however, this attempt resulted in a low sensitivity of the method. Since it was not possible to quantify the 3-MPCD without using the derivatization step, two types of derivatizing agents, HFBA and BSTFA, were subsequently tested, and BSTFA presented better results.

This method was used to quantify the concentration of 3-MCPD in 46 laboratory samples prepared in the laboratory, in the raw materials and intermediate products / cleaning waters of the process.

From the analysis of the process and according to the bibliographical references, it was concluded that there is a potential of contamination through the raw materials that contain palm oil in its constitution either directly or indirectly, of which the release oil stands out. This relationship is not direct and the procedural conditions have an influence on the degradation of 3-MCPD. However, from the analysis of the results obtained it was not possible to verify this direct relation. These preliminary results show the need to carry out further validation studies of the extraction process and the GC- MS method, as well as carry out further pilot scale and industrial scale tests, namely kinetic studies of degradation and formation of 3-MCPD, Either in the free form or in the various esterified forms

---

### Keywords:

3-MCPD, Contaminants, Chloropropanols, Palm Oil, Oils and Fats, Derivatization





# Índice

---

1.	Enquadramento e Objectivos .....	1
1.1	DanCake Portugal SA .....	2
1.2	Qualidade e Segurança Alimentar .....	3
1.2.1	Sistema HACCP:.....	3
1.2.2	3-MCPD .....	4
1.2.3	Referenciais BRC e IFS.....	4
2.	Introdução .....	7
2.1	Cloropropanóis .....	7
2.1.1	Introdução .....	7
2.1.2	Mecanismos de Formação .....	7
2.2	3-MCPD .....	9
2.2.1	Caracterização.....	9
2.2.2	Características Físicas e Químicas .....	9
2.2.3	Caracterização Estrutural.....	9
2.2.4	Aplicações .....	9
2.2.5	Configurações .....	9
2.2.6	Variáveis que influenciam o aumento da concentração de 3-MCPD.....	10
2.2.7	Toxicidade, Mutagenicidade e Riscos Para a Saúde.....	14
2.2.8	Legislação e Regulamentos.....	15
2.2.9	A sua presença na roda alimentar .....	16
2.2.10	Análise de Risco à Exposição do Composto- Faixas Etárias .....	28
2.2.11	Estabilidade do Composto.....	28
2.2.12	Cinética.....	29
2.2.13	Formação de 3-MCPD no Fabrico de Óleos e Gorduras Vegetais .....	30
2.2.14	3-MCPD pela Europa .....	33
2.2.15	3-MCPD pelo Mundo .....	35
2.2.16	Métodos Analíticos .....	36
3.	Aplicação do Caso em Estudo.....	41
3.1	Objectivos do Estudo.....	42
4.	Materiais e Métodos .....	43
4.1	Processo de Extração .....	43
4.1.1	Reagentes:.....	43
4.1.2	Materiais: .....	43
4.2	Validação do Método de Extração: .....	43
4.2.1	Procedimento:.....	44
4.3	Análise de GC/MS.....	47
4.3.1	Reagentes:.....	47
4.3.2	Materiais: .....	47

4.3.3	GC/MS: Uma Breve Introdução.....	47
4.3.4	Condições Cromatográficas .....	48
4.3.5	Estudo de Validação do Método de GC/MS .....	49
4.3.6	Derivatização.....	50
4.3.7	Tentativa de implementação da ausência de Derivatização .....	50
4.3.8	Derivatização com agente HFB.....	52
4.3.9	Derivatização com BSTFA.....	53
4.3.10	Preparação das Soluções das Amostras Extraídas .....	55
5.	Análise de resultados.....	57
5.1	Receitas Desenvolvidas.....	57
5.2	Análise Causa-Efeito.....	60
5.2.1	Matérias-Primas:.....	61
5.2.2	Outras Variáveis .....	65
5.2.3	Fornecedores.....	67
5.2.4	Processo: .....	68
5.2.5	Outras Variáveis .....	70
5.3	Análise dos Resultados Obtidos Por GC/MS Dos Bolos Luxury Preparados em laboratório ...	71
5.4	Possíveis Acções Correctivas.....	75
6.	Trabalho Futuro .....	77
7.	Conclusões .....	79
	Referências Bibliográficas.....	81
	ANEXOS .....	85
A.	Receitas Ensaios Piloto .....	85
A1)	Luxury de Limão .....	85
A2)	Luxury Cacau .....	86
A3)	Luxury Mármore.....	87
A4)	Luxury Stracciatella.....	88
B.	Cromatogramas .....	89

## Índice de Figuras

---

Figura 1- Representação esquemática dos mecanismos propostos para a formação de ésteres de 3-MCPD de acordo com Rahn e Yaylayan [3].....	8
Figura 2- Enantiómeros do 3-MCPD [4,5] .....	9
Figura 3-Monoéster e Diéster de 3-MCPD respectivamente [4,5] .....	10
Figura 4- Contribuição para a formação de 3-MCPD de cada espécie lipídica presentes na farinha comercial [11] .....	12
Figura 5- Formação de 3-MCPD através de epíclorodrina [20].....	14

Figura 6- Roda dos Alimentos, com classificação de 1 a 5 de ocorrência de níveis de 3-MCPD .....	17
Figura 7- Teor de gorduras saturadas de vários tipos de gorduras .....	19
Figura 8- Percentagem ocupada na área agrícola por cada tipo de gordura [30] .....	20
Figura 9-Produção mundial de óleo de palma (Oil Word 2016) [30] .....	20
Figura 10- Maiores Fluxos Comerciais De Óleo de Palma [29] .....	21
Figura 11- Outros países/ regiões produtores de óleo de palma com maior aumento de capacidade de produção (Oil word 2016) [30] .....	21
Figura 12- Consumo mundial de óleos e gorduras em 2015 (Oil World 2016) [30] .....	22
Figura 13- Consumo dos principais consumidores de óleo de palma ( milhões de toneladas) (Oil World 2016) [30] .....	22
Figura 14- Representação Esquemática Das Várias Representações RSPO[29] .....	24
Figura 15- Matriz Swot do Óleo de Palma .....	25
Figura 16- Comparação da Quantidade Total de Amostras Por Cada País com Altos Níveis de 3-MCPD com a Quantidade de Amostras Totais [36] .....	26
Figura 17- Isómeros de Monocloropropanediol e a sua relação com o L-Glicerol numa projecção de Fisher [2] .....	29
Figura 18- Etapas de Processamento do Óleo de Palma [44]. .....	33
Figura 19- Países com maiores índices de 3-MCPD registados em Gorduras e Óleos [7] .....	34
Figura 20- Países com maiores índices de 3-MCPD registados noutras Classes de Alimentos [7] .....	34
Figura 21- Montagem do processo de extracção, com 3 montagens em simultâneo.....	44
Figura 22- Processo de Secagem no evaporador rotativo .....	45
Figura 23- Amostra seca após processo de secagem.....	45
Figura 24- Amostras de Óleo Extraído com diferentes números de lavagem.....	45
Figura 25 - Representação da Extracção Líquido-Líquido do Aroma de Baunilha Natural com Diclorometano.....	46
Figura 26- Representação da Extracção Líquido-Líquido do Extracto de Cacau com Diclorometano.....	46
Figura 27- Estrutura do 3-MCPD d <sub>5</sub> .....	50
Figura 28- Reacção de Derivatização de 3-MCPD com HFBI e HFBA [20] .....	52
Figura 29- Caracterização Estrutural do HFBA .....	52
Figura 30- Caracterização Estrutural do BSTFA.....	54
Figura 31- Molécula Obtida após derivatização de 3-MCPD com BSTFA.....	54
Figura 32-Curva de Calibração Obtida .....	55
Figura 33- Diagrama de Ishikawa relativo aos níveis elevados de 3-MCPD das amostras em estudo. ....	60
Figura 34- Níveis de Cloro Analisados .....	62
Figura 35- Quantidade de Óleo Desmoldante (g) vs Hora .....	64
Figura 36- Média de Níveis de 3-MCPD em cada tipo de Receita (µg/kg).....	65
Figura 37- Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Cacau.....	65
Figura 38 -Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Stracciatella .....	66
Figura 39 -Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Limão.....	66
Figura 40- Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Mármore.....	66
Figura 41- Hora vs pH das Massas da Receita Standart.....	69

Figura 42- Digrama de Ishikawa referente ao erro associado às análises.....	72
---	----

## ANEXOS:

Figura B 1-Solução padrão de mistura de Grob da coluna de GC.....	89
Figura B 2- Cromatograma e espectro de massa da solução mãe de 3-MCPD (1000 ppm) com TR= 14,18 s.....	90
Figura B 3- Cromatograma e espectro de massa do padrão deuterado de 3-MCPD.....	91
Figura B 4- Sobreposição de TIC da variação concentração do padrão 3-MCPD.....	92
Figura B 5- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 100 ppm .....	93
Figura B 6- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 100 ppm com uma energia de 25 eV .....	94
Figura B 7- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm .....	95
Figura B 8- MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do ião 79 para o 61 .....	96
Figura B 9- Sobreposição dos Cromatogramas de MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do ião 79 para o 61 .....	97
Figura B 10- Sobreposição dos cromatogramas MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do ião 79 para o 61 .....	98
Figura B 11- Sobreposição dos cromatogramas do MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do ião 79 para o 44 .....	99
Figura B 12- Sobreposição do cromatograma MRM a 100 ppm da solução padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do ião 79 para o 44 partindo do 61 .....	100
Figura B 13- Sobreposição do cromatograma MRM da concentração a 100 ppm da solução Padrão de 3-MCPD da fragmentação do ião 61 para o 44.....	101
Figura B 14- Sobreposição do cromatograma MRM do ião 40 para o 120 a resultar no 61 para uma de solução padrão a 10 ppm.....	102
Figura B 15- Sobreposição da mesma energia de fragmentação necessária para diferentes fragmentações .....	103
Figura B 16- Sobreposição de diferentes fragmentações, com a mesma energia de fragmentação para a solução 3-MCPD padrão a 50 ppb.....	104
Figura B 17- Sobreposição de diferentes fragmentações, com a mesma energia de fragmentação para a solução de 3-MCPD padrão a 100 ppb.....	105
Figura B 18- Cromatograma da sobreposição em modo SIM do padrão deuterado de 3-MCPD a 13 ppm .....	106
Figura B 19- Cromatograma da sobreposição em modo SIM da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm .....	107
Figura B 20- Cromatograma da sobreposição em modo SIM da solução padrão de 3-MCPD a 100 ppb .....	108
Figura B 21- Cromatograma da sobreposição do modo SIM comparativo de dois fragmentos a 100 ppb .....	109
Figura B 22- TIC a 10 ppm da solução padrão de 3-MCPD derivatizada com HFBA.....	110
Figura B 23- TIC modo XIM da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm derivatizada com HFBA.....	111

Figura B 24- TIC modo SIM solução padrão 3-MCPD de 1 ppb derivatizada com HFBA referente ao ião <i>qualifier</i> 289 .....	112
Figura B 25- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm derivatizada com HFBA .....	113
Figura B 26- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD de 10 ppm derivatizada com HFBA .....	114
Figura B 27- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD de 10 ppm derivatizada com HFBA .....	115
Figura B 28- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD a 1 ppb derivatizado com HFBA .....	116
Figura B 29- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD de 10 ppb derivatizada com HFBA .....	117
Figura B 30- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD a 100 ppb derivatizada com HFBA .....	118
Figura B 31- TIC referente à derivatização de 3-MCPD com BSTFA .....	119
Figura B 32- TIC referente à derivatização de 3-MCPD com BSTFA em modo SIM .....	120
Figura B 33- TIC da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb .....	121
Figura B 34- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb com chamada dos vários iões .....	122
Figura B 35- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb- Modo SIM .....	123
Figura B 36 – Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb- Modo SIM com vários iões .....	124
Figura B 37- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb .....	125
Figura B 38- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb com vários iões .....	126
Figura B 39- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb- Modo SIM .....	127
Figura B 40- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb- Modo SIM com vários iões .....	128
Figura B 41- TIC Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb .....	129
Figura B 42- Cromatograma da sobreposição da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb com vários iões .....	130
Figura B 43- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb- Modo SIM .....	131
Figura B 44- Cromatograma da sobreposição Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb- Modo SIM com vários iões .....	132
Figura B 45- TIC da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb .....	133
Figura B 46- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb com vários iões .....	134
Figura B 47- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb- Modo SIM .....	135
Figura B 48- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb- Modo SIM com vários iões .....	136
Figura B 49- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb .....	137
Figura B 50- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb com vários iões .....	138
Figura B 51- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb- Modo SIM .....	139
Figura B 52- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb- Modo SIM com vários iões .....	140
Figura B 53- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb .....	141

Figura B 54- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb- com vários iões .....	142
Figura B 55- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb- Modo SIM..	143
Figura B 56- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb- Modo SIM com vários iões .....	144
Figura B 57- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal –100 ppb .....	145
Figura B 58-TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 100 ppb- Modo SIM	146
Figura B 59- Cromatografia da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 100 ppb- Modo SIM para vários iões.....	147
Figura B 60- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 125 ppb para vários iões .....	148
Figura B 61- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 125 ppb em Modo SIM para vários iões .....	149
Figura B 62-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 150 ppb para vários iões .....	150
Figura B 63 –Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 150 ppb em Modo SIM para vários iões .....	151
Figura B 64- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 200 ppb para vários iões .....	152
Figura B 65-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 200 ppb–Modo SIM para vários iões.....	153
Figura B 66- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 250 ppb- para vários iões.....	154
Figura B 67- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 250 ppb Modo SIM para vários iões .....	155
Figura B 68- Cromatograma da sobreposição da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 300 ppb- para vários iões.....	156
Figura B 69-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal- 300 ppb Modo SIM para vários iões .....	157
Figura B 70- Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com Cloro- ião 244 .....	158
Figura B 71- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com Cloro- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	159
Figura B 72-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem óleo de palma- ião 119.....	160
Figura B 73-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem óleo de palma- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	161
Figura B 74-Figura B 72-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem colco mono- ião 119 .....	162
Figura B 75-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem colco mono - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	163
Figura B 76-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem aroma de Limão- ião 119..	164

Figura B 77-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem aroma de limão - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	165
Figura B 78-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com água destilada- ião 244.....	166
Figura B 79-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com água destilada- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	167
Figura B 80-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com triplo do limão em pó- ião 119 .....	168
Figura B 81-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com triplo do Limão em pó - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	169
Figura B 82-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com mínimo do óleo desmoldante - ião 119 .....	170
Figura B 83-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com mínimo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	171
Figura B 84-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com triplo do óleo desmoldante - ião 119 .....	172
Figura B 85-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com triplo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	173
Figura B 86-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem glicerina - ião 119.....	174
Figura B 87-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem glicerina - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	175
Figura B 88-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com farinha fornecedor Granel - ião 119 .....	176
Figura B 89-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com farinha de fornecedor Granel - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	177
Figura B 90-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão Standart- ião 119.....	178
Figura B 91-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão Standart- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	179
Figura B 92-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão dobro do sal- ião 119.....	180
Figura B 93- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com Dobro do Sal- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	181
Figura B 94-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com metade do óleo de palma- ião 119 .....	182
Figura B 95- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com metade do óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	183
Figura B 96-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com cloro - ião 119 .....	184
Figura B 97-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com cloro - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	185
Figura B 98-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella sem óleo de palma - ião 119 .....	186
Figura B 99-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella sem óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	187

Figura B 100-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com água destilada- ião119 .....	188
Figura B 101-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com água destilada- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	189
Figura B 102-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com mínimo de óleo desmoldante- ião119.....	190
Figura B 103-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com mínimo de óleo desmoldante- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	191
Figura B 104-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com triplo de óleo desmoldante- ião119.....	192
Figura B 105-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com triplo de óleo desmoldante- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	193
Figura B 106-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella sem glicerina- ião119 ....	194
Figura B 107-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella sem glicerina - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	195
Figura B 108-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella fornecedor farinha Granel- ião119 .....	196
Figura B 109-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella fornecedor farinha Granel - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	197
Figura B 110-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella Strandart - ião119 .....	198
Figura B 111-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella Standart - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	199
Figura B 112-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella dobro do sal - ião119.....	200
Figura B 113-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella dobro do sal - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	201
Figura B 114- Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau metade do óleo de palma - ião119 .....	202
Figura B 115-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau metade do óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	203
Figura B 116-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau metade com cloro - ião119.....	204
Figura B 117-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com cloro - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	205
Figura B 118-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau metade com metade do óleo de palma - ião119.....	206
Figura B 119-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com metade de óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	207
Figura B 120-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau sem colco mono-ião119.....	208
Figura B 121-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau sem colco mono - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	209
Figura B 122--Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau com água destilada-ião119.....	210



Figura B 123-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com água destilada - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	211
Figura B 124-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau com mínimo de óleo desmoldante- ião119 .....	212
Figura B 125-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com mínimo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	213
Figura B 126-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau com triplo de óleo desmoldante- ião119 .....	214
Figura B 127-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com triplo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	215
Figura B 128-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau sem glicerina-ião119.....	216
Figura B 129- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau sem glicerina- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	217
Figura B 130-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau fornecedor de farinha Granel- ião119 .....	218
Figura B 131-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau fornecedor de farinha Granel- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	219
Figura B 132-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau Standart -ião119.....	220
Figura B 133-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau Standart- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	221
Figura B 134-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau dobro do sal -ião119.....	222
Figura B 135-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau dobro do sal- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	223
Figura B 136-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Mármore com cloro -ião119.....	224
Figura B 137-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com sal- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	225
Figura B 138- Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Mármore sem óleo de palma -ião119 .....	226
Figura B 139- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem óleo de palma- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	227
Figura B 140-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem colco mono- ião 119.....	228
Figura B 141-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem colco mono- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239.....	229
Figura B 142-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com água destilada - ião 119 ..	230
Figura B 143-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com água destilada - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	231
Figura B 144-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com mínimo de óleo desmoldante - ião 119 .....	232
Figura B 145-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com mínimo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	233

Figura B 146-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com triplo de óleo desmoldante - ião 119 .....	234
Figura B 147-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com triplo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	235
Figura B 148-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem glicerina - ião 119 .....	236
Figura B 149-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem glicerina - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	237
Figura B 150-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore Starndart - ião 119.....	238
Figura B 151-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore Standart - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	239
Figura B 152- Cromatograma TIC de 3-MCPD da Água de Lavagem das formas- ião 119 .....	240
Figura B 153-Cromatograma TIC de 3-MCPD da água de lavagem das formas- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	241
Figura B 154-Cromatograma TIC de 3-MCPD do Cacau DB11- ião 119.....	242
Figura B 155-Cromatograma TIC de 3-MCPD do Cacau DB11- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	243
Figura B 156-Cromatograma TIC de 3-MCPD da Cobertura de Chocolate- ião 119.....	244
Figura B 157-Cromatograma TIC de 3-MCPD da Cobertura de Chocolate- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239 .....	245

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1-Efeito da produção de 3-MCPD durante o processo de cozedura na presença de ácidos orgânicos (com 1% w/w de farinha) [11] .....	14
Tabela 2-- Constantes Cinéticas e Respetivas Temperaturas [11] .....	30
Tabela 3-Métodos Analíticos Indirectos para a análise de MCPD e ésteres glicídicos [35] .....	39
Tabela 4-Critérios Legais Relativos aos níveis de 3-MCPD até Março de 2016.....	41
Tabela 5-Critérios Legais relativos aos níveis de 3-MCPD a partir de Março de 2016 .....	41
Tabela 6-Receitas Desenvolvidas na Fábrica Piloto.....	57
Tabela 5-7-Resultados analíticos dos níveis de cloro realizados pelo laboratório interno durante os períodos de tempo determinados .....	61
Tabela 8- Resultados Obtidos por GC/MS para a Referência de Stracciatella.....	71
Tabela 9- Resultados Obtidos por GC/MS da Referência de Limão .....	71
Tabela 10- Resultados Obtidos por GC/MS para a Referência de Cacau.....	71
Tabela 11-Resultados Obtidos por GC/MS para a Referência de Mármore.....	71
Tabela 12- Resultados Obtidos por GC/MS para as Matérias-Primas.....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

**1,3-DCP-** 1,3-dicloropropano

**2-MCPD-** 2-monocloropropano-1,2-diol

**3-MCPD-** 3-monocloropropano-1,2-diol

**AESA-** Agriconsulting Europe S.A

**ASAE-** Autoridade de Segurança Alimentar

**a<sub>w</sub>**- Teor de água livre

**BFR-** Instituto Federal de Avaliação dos Riscos

**BPA-** Bisfenol A

**BRC-** Consórcio Inglês de Retalho

**BSTFA-** N,O bis( trimetilsilil)trifluoro-acetamida

**CONTAM-** Painel da EFSA dos Contaminantes da Cadeia Alimentar

**CVUA-** Centro de Investigação Química e Veterinária De Estugarda

**DAG's-** Diacilgliceróis

**DCP-** Dicloropropanol;

**DGF-** Sociedade Alemã para as Ciências Fettwis

**EFSA-** Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

**EPA-** Agência de Protecção Ambiental

**FEDIOL-** Federação Representativa dos Óleos e Vegetais

**FEI-** Instituto de Pesquisa Alemão

**FFA-** Ácidos Gordos Livres

**FSANZ:** Segurança Alimentar da Austrália e Nova Zelândia

**GC-MS:** Espectrometria de Massa por Cromatografia Gasosa

**MCPD-** Monocolopropanol

**MRM-** Monitorização por Reacção Molecular

**HACCP-** Análise de Perigos e de Pontos Críticos de Controlo

**HFB-** Ácido Heptafluorobutírico

**HFBA-** Ácido Heptafluorobutírico Anidro

**HFBI-** Heptafluorobutilimidazol

**HVP-** Proteínas Vegetais Hidrolisadas

**IARC-** Agência Internacional de Investigação do Cancro

**IFS-** Segurança Alimentar Internacional

**LOD-** Limite de Detecção

**LOQ-** Limite de Quantificação

**MAG's-** Monoacilgliceróis

**MCPD-** Monocloropropanodiol

**Mg-** Miligramas

**MRI** – Instituto Max Rubner

**NaCl-** Cloreto de Sódio

**OMS-** Organização Mundial de Saúde

**Ppm-** Partes por milhão

**Ppb-** Partes por bilhão

**RSPO-** “Mesa Redonda” de Óleo Palma Sustentável

**SCF-** Comité Científico dos Alimentos da Comunidade Europeia

**SIM-** Monitorização Singular de Iões

**TAG's-** Triacilgliceróis

**TMS-** Trimetilclorosilano;

**TDI-** Limite Tolerável Diário

**UE-** União Europeia

**µg-** Micrograma

**µl-** Microlitro;

# 1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

---

Ao longo dos últimos anos, registou-se um grande investimento por parte da indústria alimentar no controlo de qualidade e segurança alimentar, e um dos focos é o controlo da formação de contaminantes alimentares. Na tentativa de poder conciliar a garantia de qualidade com uma longa durabilidade, as empresas do ramo alimentar recorrem frequentemente à alteração de processos de fabrico e à adição de aditivos alimentares, que por sua vez são agentes percursores da formação de alguns tipos de contaminantes.

Os Cloropropanóis são uma classe de contaminantes que se formam quando o glicerol reage com o cloro sob condições ácidas na presença de temperaturas elevadas, e a sua presença tem sido cada vez mais comum numa ampla gama de alimentos e ingredientes alimentares. Similarmente aos cloropropanóis, os seus ésteres podem-se classificar em ésteres de MCPD ou de DCP, dependendo do número de átomos de cloro da molécula.

O 3-MCPD é a forma relatada em maiores quantidades, seguida do 2-MCPD, 2,3-DCP e 1,3-DCP [1,2]. Tendo sido detectado pela primeira vez em gorduras vegetais hidrolisadas (HVP) na década de 80, desde então, tem-se registado um investimento progressivo no estudo do comportamento do 3-MCPD. No decorrer de várias pesquisas, foi observada a presença de 3-MCPD numa ampla gama de alimentos, desde do leite em pó indicado para recém-nascidos, até produtos provenientes da panificação e pastelaria.

Os valores relativos à exposição ao 3-MCPD têm sofrido decréscimos ao longo do tempo. Os valores máximos toleráveis diários (TDI) recomendados pela EFSA foram primeiramente de  $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  por peso corporal (60 kg), passando para o valor actual estabelecido de  $0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o mesmo peso corporal.

A presença deste cloropropanol encontra-se centralizada principalmente no grupo alimentar dos “Óleos e Gorduras” onde merece destaque o óleo de palma, presente como matéria-prima em muitos produtos da indústria alimentar. No entanto, a formação de 3-MCPD já se verificou também na natureza, como no leite materno.

Em 2013, o 3-MCPD foi considerado pela Agência Internacional de Pesquisa Contra O Cancro (IARC) como possível carcinogénico humano em testes realizados em ratos, onde se verificou uma capacidade genotóxica *in vitro* devido à mutação induzida registada com várias estirpes de *Salmonella Typhimurium* e das rupturas de filamentos de DNA num ensaio realizado com células dos ovários de um hamster chinês [2].

A preocupação em torno da presença de ésteres de 3-MCPD em alimentos foi reforçada pelo facto de ter sido provado que estes representam uma fonte adicional de exposição à forma livre do composto, aquando hidrolisados na totalidade no sistema digestivo humano[1]. Existem também estudos que referem que este cloropropanol tem a capacidade de ultrapassar a barreira sangue-cérebro e sangue-testículos [23].

Assim, a ingestão de alimentos que contenham 3-MCPD, quer na forma esterificada ou livre, têm sido alvo de grande preocupação e estudo por parte da indústria alimentar a nível mundial, já que a exposição às várias formas do composto cresce exponencialmente com o consumo de alimentos processados presentes diariamente na nossa dieta.

A Alemanha é um dos países que, ultimamente tem tido mais interveniência no controlo e prevenção deste tipo de contaminante alimentar, sendo um dos países da UE que regista maior número de estudos relativamente a esta temática.

Enquadrando o tema na empresa em causa, há que primeiramente referir que a DanCake Portugal SA é uma das maiores empresas produtoras de produtos alimentares de origem pasteleira em Portugal. Esta e outras características exigem creditação da mesma por várias entidades certificadoras, nomeadamente BRC e IFS, que lhe conferem garantia de qualidade e de exportação para vários países dentro e fora da UE.

Um dos seus maiores clientes é alemão e exige que todos os seus produtos tenham valores de 3-MCPD inferiores em cerca de 50% aos limites recomendados pela EFSA e por isso, no caso em estudo, pretende-se averiguar meios de redução deste composto nos bolos vendidos ao cliente, que actualmente tem registado valores não conformes, tendo em conta as exigências do mesmo.

A implementação de um método de extracção e análise laboratorial ao 3-MCPD também é um dos objectivos deste tema, permitindo à empresa implementar um controlo interno dos níveis do composto em todos os produtos desejados.

Vão ser realizados vários ensaios laboratoriais a várias receitas de bolos previamente desenvolvidas à escala piloto das quais constam, bolo Mármore, Stracciatella, Cacao e Limão.

Estas análises vão ter como objectivo determinar as possíveis causas do aumento do composto tendo em conta as condições de operação e processo, bem como respectivas matérias-primas e fornecedores. Ter-se há em conta factores operacionais como a temperatura, tempo de cozedura e erros de medição (manuais e automáticos) e principalmente factores químicos que, directa ou indirectamente estejam relacionados com alguns ingredientes presentes nas diferentes receitas.

## **1.1 DanCake Portugal SA**

A DanCake Portugal SA é uma empresa Portuguesa fundada em 1978 que desenvolve desde então, uma ampla gama de produtos na área alimentar, mais propriamente bolos e produtos de confeitaria, sendo reconhecida a nível nacional por *DanCake* e internacionalmente por *Danesita*.

A inauguração da 1ª linha de fabrico de tortas em Portugal deu-se no seu ano de arranque, inaugurando mais tarde em 1982 a unidade de Coimbra, que contava com 2 linhas de produção de queques e pipocas.

A inauguração da unidade da Póvoa de Santa Iria realizou-se posteriormente em 1993, o que contribuiu para a extensão da sua exportação para o Reino Unido e para o Brasil.

Ao longo dos anos seguintes, foram realizados investimentos tecnológicos através da implementação de maquinaria e automação das linhas. Esta inovação agiu muito no sentido do aumento de produtividade, tendo recorrido aos próprios recursos para a promoção do aumento da eficiência de produção e, consequentemente da competitividade.

Em 2001 a unidade de Coimbra é certificada pela Norma NP EN ISO 2001(1995) e 4 anos mais tarde, a marca é conhecida como um dos maiores produtores de biscoitos de manteiga do mundo, atingindo cerca de 60% das vendas totais na exportação para mais de 50 países.

O ano de 2005 marcou a empresa pela certificação de ambas unidades fabris pelos referenciais BRC (versão 3, 2003) e IFS (versão 4, 2004).

Com a comemoração de 30 anos de existência, a DanCake decide apostar numa nova imagem, no âmbito de cativar o público-alvo.



Mais recentemente em 2012, ambas as fábricas são certificadas para o uso de óleo de palma sustentável (RSPO) e dois anos mais tarde, a marca decide inovar a apostar numa nova imagem que os definisse como profissionais de excelência na sua área, e apresenta uma nova imagem e logótipo, que se mantém até aos dias de hoje.

Em 2015 destaca-se pela atribuição do Prémio Inovação 2015 e mantém a sua imagem de marca direccionada para a garantia de qualidade, juntamente com a garantia de qualidade actual.

Actualmente, a unidade de Lisboa conta com uma capacidade de produção de 32 kton por ano, obtidas pela produção de produtos como tortas, bolachas, bolos, crackers, tostas e folhados. Todos estes produtos são produzidos num total de 10 linhas.

A unidade de Coimbra centra-se mais na produção de biscoitos (*butter cookies* e *american cookies*), *croissants* e *palitos de la reine*, produzindo cerca de 23 kton por ano na presença de 9 linhas de operação. A exportação ocupa cerca de 75% da sua produção total, o que faz com que o mercado a nível mundial seja a sua principal fonte de receita.

O seu leque de exportação conta com um total actual de 82 países, onde é oferecida uma ampla variedade de produtos que vão de encontro às necessidades e desejos de cada cliente e mercado.

A visão da empresa situa-se então por ser Parceiro Global de pastelaria com **Receitas de Amor para valorizar e celebrar a vida.**

## 1.2 Qualidade e Segurança Alimentar

A DanCake encontra-se certificada por várias normas inerentes à qualidade e segurança alimentar que permitem à empresa possuir distinção por parte dos consumidores relativamente à qualidade do produto final.

### 1.2.1 Sistema HACCP:

A aplicação de um sistema preventivo de Higiene e Segurança Alimentar tem como objectivo permitir a obtenção de alimentos com qualidade e segurança, reduzindo ao mínimo a probabilidade de contaminação do produto e minimizar os riscos de higiene, conduzindo a um aumento do grau de confiança dos consumidores [53].

O sistema de HACCP constitui uma série de medidas preventivas e de controlo que envolvem todas as fases, desde a selecção das matérias-primas e materiais de embalagem até à expedição, passando também pelas etapas de fabrico.

A DanCake produz diversos tipos de produtos, dos quais constam:

- ButterCookies;
- Tostas;
- Tortas;
- Bolos simples e recheados;
- Queques e Madalenas simples e recheados;
- Biscoitos e Bolachas;
- Croissants;

- Pipocas;
- Waffles;
- Palitos;
- Crackers;
- Folhados;

Todos os produtos acima mencionados possuem um tipo de formulação, forma de apresentação e características organolépticas, físicas e químicas próprias. No entanto, apresentam em comum as etapas principais para a sua produção das quais constam:

- Preparação das matérias-primas;
- Amassagem;
- Formação;
- Cozedura;
- Arrefecimento e posterior embalagem;

Existe posteriormente algumas etapas aplicáveis a um tipo específico de produtos, como é o caso de recheio para os produtos recheados, ou a tostagem, na produção de tostas.

O sistema HACCP aplica-se por isso a todas as fases necessárias ao fabrico destes produtos, desde a recepção das matérias-primas e materiais de embalagem, até à armazenagem e expedição do produto acabado.

No desenvolvimento do sistema HACCP, foram incluídos todos os tipos de perigo: físicos, químicos e (micro) biológicos.

### 1.2.2 3-MCPD

Este tipo de contaminante alimentar não se encontra contemplado no levantamento de perigos inerentes às matérias-primas, já que a legislação portuguesa até hoje não tem em conta a presença de 3-MCPD em classes alimentares. No entanto, como o cliente Alemão exige que os produtos para si vendidos tenham um limite 50% inferior ao limite estabelecido pela legislação, a DanCake inclui a análise ao 3-MCPD no seu plano analítico de produto acabado conforme a legislação.

### 1.2.3 Referências BRC e IFS

No âmbito de conferir a capacidade de exportação à empresa, a DanCake encontra-se certificada pelos referenciais BRC e IFS, o que lhe permite estender a sua produção a uma ampla gama de países e continentes.

#### 1.2.3.1 BRC

O BRC consiste num referencial publicado pela BRC (British Retail Consortium) com carácter obrigatório para todos os fornecedores dos retalhistas do Reino Unido. Com a envolvimento das grandes empresas do ramo alimentar, a certificação de acordo com o BRC é um processo baseado em auditorias direccionadas aos fornecedores de alimentos dos grandes retalhistas do Reino Unido. A adopção deste referencial alargou-se nos diversos continentes, possibilitando uma diminuição do número de auditorias e uniformizando os critérios de avaliação dos requisitos [54].

### 1.2.3.2 IFS

O IFS (International Food Standard) foi desenvolvido por empresas retalhistas alemãs no âmbito de estabelecer requisitos de auditoria a fornecedores de produtos alimentares. Em 2003, os retalhistas Franceses juntaram-se ao grupo de trabalho IFS e contribuíram para o desenvolvimento da actual versão da Norma [54].

### 1.2.3.3 Quais são as principais diferenças entre o BRC e IFS?

Ambos são dirigidos a fornecedores de retalho, porém cada um opta por vertentes diferentes. Apesar de possuírem princípios idênticos, os critérios diferem. Possuem a semelhança de permitir que uma terceira entidade realize auditorias combinadas, porém os relatórios exigidos são muito diferentes. A diferença entre o BRC e o IFS parece dever-se no entanto, maioritariamente a diferenças culturais: o BRC, por exemplo, aceita a certificação de um fornecedor mesmo que algum requisito importante não seja cumprido, desde que existam evidências de presença de acções correctivas em 28 dias, enquanto que o IFS não permite a emissão de um certificado em caso de qualquer desvio que seja considerado significativo [54].



## 2. INTRODUÇÃO

---

### 2.1 Cloropropanóis

#### 2.1.1 Introdução

A formação de compostos tóxicos tem sido considerada uma questão determinante relativa ao tema da segurança alimentar. Estes compostos muitas vezes não são detetados diretamente nas matérias-primas, sendo formados de forma não intencional por intermédio de reacções químicas que ocorrem entre substâncias naturalmente presentes e/ou adicionadas nos alimentos.

Nas últimas décadas em particular, os cloropropanóis têm vindo a ocupar uma posição bastante relevante no que toca à preocupação dos profissionais da área alimentar.

Pertencendo a um grupo de contaminantes clorados derivados do glicerol, os cloropropanóis são caracterizados estruturalmente por álcoois e diois de 3 átomos ligados a 1 ou 2 átomos de cloro[3] .

A sua presença nos alimentos foi descoberta por *Velisek et al.* (1978), em lípidos hidrolisados por ácido clorídrico, denominados HVP que são usados como agentes aromatizantes, com a finalidade de enriquecer o sabor de alguns alimentos. Esta pesquisa foi desencadeada por vários estudos realizados pelo Instituto de Tecnologia Química na cidade de Praga na República Checa, que foram posteriormente publicados em 1980[3] .

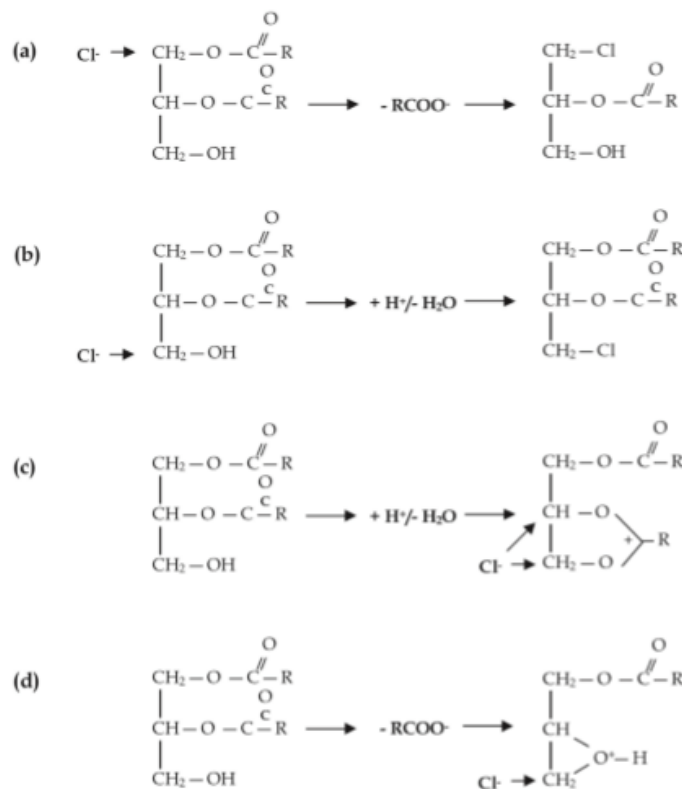
#### 2.1.2 Mecanismos de Formação

Relativamente aos mecanismos de formação inerentes aos cloropropanóis e respectivos ésteres, segundo os autores Rahn e Yaylayan [3] ,podem ser propostos 4 tipos de mecanismos, 2 dos quais envolvem um ataque nucleofílico directo por parte dos átomos de carbono da estrutura do glicerol na molécula de acilglicerois pelo ião cloreto.

Os outros 2 restantes envolvem a formação de compostos intermediários reactivos a partir dos acilglicerois como um ião aciloxónio ou epóxido, antes do ataque nucleofílico pelo ião cloreto.

É de notar que estes mecanismos são maioritariamente desencadeados com acção de altas temperaturas (100°C-230°C).

A figura 1 apresenta uma representação esquemática dos mecanismos descritos:



**Figura 1- Representação esquemática dos mecanismos propostos para a formação de ésteres de 3-MCPD de acordo com Rahn e Yaylayan [3], onde a legenda corresponde a : a) Directo na posição sn-1; b) Directo na posição sn-3; c) Do ião aciloxónio e d) Do ião epóxido.**

O ataque nucleofílico directo pode tanto ocorrer nas posições sn-1 como na sn-3, estando dependente do impedimento estérico dos átomos de carbono na molécula, ocorrendo assim uma deslocação ou de um grupo éster ou hidroxilo. Posteriormente ocorre a formação de ésteres de 3-MCPD [3].

Em meio aquoso a reacção dá-se a partir de diacilgliceróis (*DAG's*) e monoacilgliceróis (*MAG's*) sob condições ácidas, havendo a deslocação do grupo hidroxilo[3] .

Porém, estudos efetuados por os autores Rahan e Yaylayan [3] demonstraram que os iões aciloxónios podem ser formados por meio não aquoso a partir de *MAG's*, *DAG's* e *TAG's* (triacilgliceróis), através do ataque nucleofílico interno do carbonilo do grupo éster. Esta descoberta foi feita através da técnica de espectroscopia por infravermelho aproximada à transformada de Fourier.

Suspeitou-se primeiramente que os *DAG's* seriam os principais precursores da reacção. O óleo de palma, por exemplo, possui na sua composição cerca de 95% de *TAG's*, 12% de *DAG's* e 0,3% de *MAG's*, tendo-se estabelecido uma relação de proporcionalidade entre o seu teor de acilgliceróis parciais (dos quais constam *MAG's* e *DAG's*), o tempo de colheita do fruto e o seu respectivo processamento, já que existe referência à degradação dos *TAG's* através da acção enzimática hidrolítica presente na casca do fruto.

No entanto, acabou por não se chegar a nenhuma conclusão concreta, e não se conseguiu relacionar directamente os níveis de *DAG's* à formação dos ésteres de 3-MCPD, já que na etapa da desodorização do óleo de palma pode reagir com o ião cloreto e formar então o contaminante, mas nada garante que esta etapa seja determinante[3] .

## 2.2 3-MCPD

### 2.2.1 Caracterização

O 3-MCPD, com denominação IUPAC de 3-Monocloropropano-1,2,diol, também conhecido por  $\alpha$ -clorohydrin e glicero  $\alpha$ -monoclorohydrin, faz parte desta classe de contaminantes alimentares acima referida [4].

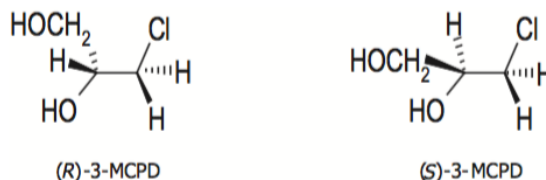
Os níveis típicos de 3-MCPD nos alimentos em geral variam entre 0,1 a 20%, dependendo depois do género alimentar a que pertencem e com o processo de transformação que podem sofrer [5].

### 2.2.2 Características Físicas e Químicas

Com a fórmula molecular  $C_3H_7ClO_2$  e uma massa molecular relativa de 110,54 g/mol, o 3-MCPD é um líquido incolor, podendo apresentar uma cor amarelada. Apresenta uma densidade de 1,32 g/cm<sup>3</sup> e um ponto de ebulição de 213°C, e é altamente solúvel em água e em solventes com polaridade alta como o metanol, etanol, clorofórmio e etil-acetato (IARC 2013). É considerada uma molécula com uma polaridade alta e tem tendência a reagir com ácidos, álcoois, aldeídos, amónia, cetonas e tióis[6].

### 2.2.3 Caracterização Estrutural

Sendo considerada uma molécula quiral, o 3-MCPD apresenta enantiómeros (*R*) e (*S*) derivados do L-Glicerol pro-quiral que se apresentam numa porção de 1:1 [4,6].



**Figura 2- Enantiómeros do 3-MCPD [4,5]**

### 2.2.4 Aplicações

Fora da área alimentar, o 3-MCPD tem outras aplicações nomeadamente para uso industrial, onde é aplicado para induzir a diminuição do ponto de congelamento da dinamite, como intermediário de corante e como solvente para o acetato de celulose. Também foi listado como raticida com o nome de “*alfa-chlorohydrin*” pela Agência de Protecção Ambiental Americana (EPA 2014) [6].

### 2.2.5 Configurações

O 3-MPCD pode ser encontrado na sua forma livre ou sob a forma de ésteres, que se podem dividir entre mono-ésteres e di-ésteres, sendo os mono-ésteres a forma mais abundante.



**Figura 3-Monoéster e Diéster de 3-MCPD respectivamente [4,5]**

A existência de ésteres de 3-MCPD levanta uma grande preocupação no que toca à exposição que proporcionam à forma livre do composto. Já foi provado inclusivamente em avaliações publicadas em Maio e Julho de 2016 pelo Instituto Federal de Avaliação dos Riscos (BFR) que os ésteres de ácidos gordos de 3-MCPD são 100% hidrolisados pelo sistema digestivo humano após ingeridos [7]. A libertação da forma livre de 3-MCPD da sua estrutura, é desencadeada via lipase catalisada por uma reacção de hidrólise no tracto intestinal humano durante a digestão.

Segundo um artigo do Instituto de Tecnologia Química de Praga que faz referência à formação de 3-MCPD em produtos provenientes da batata, normalmente, a quantidade de 3-MCPD em qualquer alimento ou ingrediente alimentar libertado pela hidrólise de ésteres de 3-MCPD excede largamente a quantidade do mesmo composto na forma livre, podendo exceder uma quantidade até 100 vezes maior [8,9].

## 2.2.6 Variáveis que influenciam o aumento da concentração de 3-MCPD

### Temperatura

Sabe-se que a temperatura age como agente catalisador para a cinética da reacção na forma livre do composto, e pode ou não estar associada a outro tipo de agentes precursores [7].

Mais concretamente, são gamas de temperaturas altas que contribuem para a reacção de formação de 3-MCPD (entre 100°C-230°C).

### Presença de Glicerol

Segundo informação proveniente de uma edição de um jornal da *EFSA*, o glicerol pode ser considerado como o melhor precursor para a formação de 3-MCPD[10]. Por exemplo, existe referência de que a contribuição do glicerol para a formação do 3-MCPD é cerca de 68% durante o processo de *baking* [12] e que no caso de alimentos fermentados, o teor de glicerol é proporcional à quantidade de levedura adicionada em determinada receita e ao tempo de cozedura da mesma [11].

Foi também verificada a presença de glicerol na farinha, porém, registou-se maiores quantidades do composto em farinha que é sujeita a tempos de armazenamentos mais longos, do que em farinha considerada “fresca”[11].



## **Tempos de Cozedura**

Já foi provado que os tempos de exposição a altas temperaturas influenciam muitos dos agentes precursores à formação do 3-MCPD, o que torna por si só este factor, igualmente um agente precursor à sua formação. O tempo de cozedura também é tido em consideração em produtos fermentados com uma certa quantidade de levedura, já que este factor influencia de maneira exponencial a formação de 3-MCPD no produto final [11] .

## **Presença do Ião Cloreto e Quantidade de Água Adicionada**

A quantidade de água tratada por cloro, adicionada ao produto alimentar tem vindo a ser uma variável a ter em conta na avaliação das concentrações de 3-MCPD no produto final [11] , e a contribuição da molécula de cloro na formação deste contaminante já tem vindo a demonstrar resultados significativos.

## **pH**

O pH é um elemento chave na determinação dos níveis do 3-MCPD, pois alimentos mais ácidos apresentam uma maior tendência de formação deste contaminante [10] .

Foi inclusivamente, verificada a existência de uma equação de velocidade para a degradação de 3-MCPD nos agentes hidrolisados com pH elevado, tendo-se recorrido à derivação da mesma equação, que levou à conclusão da existência de uma reacção de ordem 1, demonstrando que o contaminante era instável em gamas de pH acima dos 6 valores [11] .

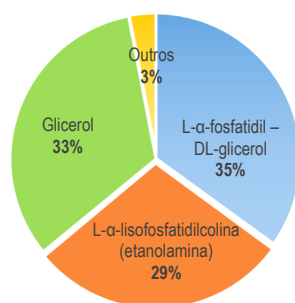
## **Tempos de Armazenamento**

Longos tempos de armazenamento em certos tipos de alimentos estão associados a um crescimento de ésteres de 3-MCPD. A Farinha é um dos exemplos [14] .

## **Produtos de Origem Cereal**

Existe conhecimento que nos produtos de origem cereal, nomeadamente produtos alimentares provenientes da semente do trigo, quando sujeitos a altas temperaturas desencadeiam a formação do composto, como se pode verificar mais a frente no ponto *Produtos provenientes da panificação e pastelaria*.

Segundo uma fonte da *EFS*, existe um produto que merece um maior destaque: a farinha. Neste seguimento, foi feito um estudo sobre a composição lipídica da farinha comercial, apresentados na figura 4 [11] :



**Figura 4- Contribuição para a formação de 3-MCPD de cada espécie lipídica presentes na farinha comercial [11]**

Em conclusão, pode-se afirmar que a farinha apresenta um elevado teor lipídico na sua constituição e que o glicerol ocupa uma parte significativa da sua composição lipídica, estando presente em cerca de 33% do total de lípidos.

### **Concentração de Lípidos e de Sal**

A presença de cloreto de sódio nos alimentos (denominado usualmente como sal) também tem vindo a ser alvo de estudo por ser um possível agente precursor à formação de 3-MCPD, sendo a sua concentração fortemente dependente da concentração deste ião. O cloreto de sódio tende a reagir com os lípidos presentes no alimento e assim se forma o composto [8] . Existe uma linearidade entre a formação de 3-MCPD e o teor deste ingrediente com a junção de gorduras e por isso, quanto maior a concentração de lípidos e cloreto de sódio maior vai ser a formação do contaminante [3,15] .

Segundo outra fonte onde foi elaborado um estudo numa série de alimentos, os que apresentavam maiores índices de 3-MCPD eram os que continham na sua formulação um maior teor de sal e gordura juntamente com um maior teor de água (cerca de 30%) [11] .

### **Presença de Malte**

O malte é um dos principais ingredientes presentes na produção de cerveja, sendo produzido principalmente a partir dos grãos de cevada, que são humedecidos e colocados para germinar. Pode também ser proveniente do trigo, centeio, arroz ou milho, sendo então denominado de acordo com a planta que deu origem ao produto [16].

Para a formação de 3-MCPD, a presença deste ingrediente exige a exposição a altas temperaturas (200°C), sendo a sua cor um factor que oscila com estas condições, verificando-se uma relação relativamente forte entre a cor do malte e o conteúdo de 3-MCPD.

No entanto, em testes em escala piloto relativos ao comportamento deste ingrediente no produto final (em produtos secos e torrados), concluiu-se que ocorreu uma redução do nível de 3-MCPD com a sua exposição a temperaturas mais altas (> 200°C), o que leva a crer que para este precursor, existe uma temperatura óptima de formação de produto. No entanto, esta hipótese teve que ser descartada pois nesta gama de temperaturas, poderia haver perigo de combustão dos grãos de malte e alteração das propriedades organolépticas do produto [11].

## Processos de Manipulação dos Alimentos

A formação do composto não está só associada a produções em massa, ou a nível industrial. Já foram verificados níveis elevados de 3-MCPD em etapas de processamento de alimentos a nível doméstico como a fritura, cozedura, grelha e até tostagem [14] .

Porém é importante referir que nos processos de defumação ao contrário da maioria dos processos, os lípidos não são precursores à formação de 3-MCPD [17] .

## Actividade da água ( $a_w$ )

A actividade de água, normalmente denominada por  $a_w$ , tem como função quantificar a quantidade de água livre nos alimentos para a formação de vida microbológica e é expressa pela seguinte equação:

$$a_w = \frac{P_{\text{vapor da água nos alimentos}}}{P_{\text{vapor da água pura}}}$$

### Equação 1- Equação do teor de água livre num alimento

Há portanto, conhecimento de uma relação da formação do 3-MCPD com o  $a_w$ . Verificou-se que alimentos que apresentavam níveis mais baixos deste parâmetro, estavam associados a um alto teor de gordura logo, têm maior tendência para a formação de ésteres de 3-MCPD [17] .

Foi também verificado que o teor de água estimado para a formação do composto é abaixo dos 15% [11] .

## Aditivos Alimentares

Existe também um aumento da formação de 3-MCPD quando a adição de certos edulcorantes, das quais se dá destaque à sucralose [4] .

## Outros Tipos de Ingredientes

A adição de gordura e de certos ingredientes como açúcar, farinha, farinha de soja, sulfato de cálcio e mono e diglicerídeos de gorduras comestíveis pode influenciar a concentração de 3-MPCD no produto final, tendo um efeito mais considerativo o açúcar e todo o tipo de emulsionantes, tais como ácido diacetil-tartárico, ácidos gordos, e mono e diglicerídeos [18] .

Relativamente aos ácidos formados quando a adição de açúcar numa massa onde a farinha está presente, existem dados que revelam qual desses ácidos contribuem mais para a formação de 3-MCPD. Tais resultados são demonstrados na tabela seguinte:

**Tabela 1-Efeito da produção de 3-MCPD durante o processo de cozedura na presença de ácidos orgânicos (com 1% w/w de farinha) [11]**

Ácido Orgânico	3-MCPD produzido (µg/kg)	pKa
Acético	15.9	4.8
Ácido L-Málico	24.4	3.4
Ácido DL-Málico	26.6	3.4
Ácido Cítrico	25.6	3.1
Ácido Tartárico	33.1	3.0

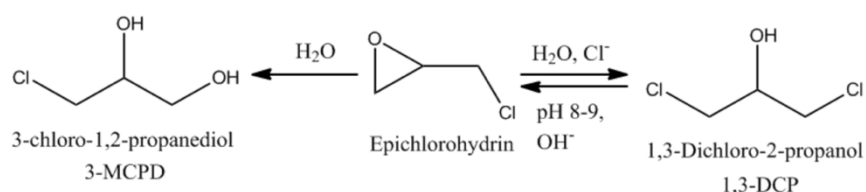
Foi concluído que ácidos com um valor mais baixo de pKa demonstraram um impacto maior na formação de 3-MCPD.

## Embalagem

Também já foi tido em consideração que os materiais de embalagem pudessem de alguma forma contribuir para a migração do composto para o produto alimentar.

Segundo o artigo “*Scientific Opinion*” da EFSA de Março de 2016 e um artigo publicado pela *Codex Alimentarius Commission* de Novembro de 2015, compostos provenientes de resinas de papel de revestimento com resistência à humidade, como a epiclorodrina podem conduzir à migração do composto para o alimento revestido, sendo o composto formado quando a epiclorodrina entra em contacto com moléculas de água como se pode observar na figura 5. A Directiva Europeia 2002/72/CE, entrou em vigor em 2002 e estabelece uma quantidade máxima de epiclorodrina residual no produto acabado de 1 mg/kg<sup>3</sup> [5,16].

No que toca ao processo de revestimento também foi dado destaque às embalagens cujo lado de contacto com os alimentos é de polietileno revestido por extrusão. No entanto não foi encontrada nenhuma evidência conclusiva para uma migração significativa através deste tipo de material de embalagem [19].



**Figura 5- Formação de 3-MCPD através de epiclorodrina [20]**

### 2.2.7 Toxicidade, Mutagenicidade e Riscos Para a Saúde

Em 2011, a Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou o 3-MCPD na categoria 2B como possível agente cancerígeno para seres humanos [21]. No entanto, não há por enquanto resultados de estudos em humanos, havendo apenas registos de ensaios laboratoriais em algumas espécies de animais como os ratos [6].

Segundo um estudo elaborado pelo centro de Segurança Alimentar do Governo de Hong Kong, o valor da mediana para a dose letal (DL<sub>50</sub>) em ratos via oral foi de 150 mg/kg por peso corporal. No entanto este valor não foi considerado alarmante já que foram consideradas doses exageradamente elevadas [6, 9,22].

Uma maior relevância foi atribuída a análises realizadas após ingestão de certas doses de contaminantes semelhantes às que o humano poderia estar exposto, a uma certa população de ratos. Os resultados indicaram que os efeitos colaterais podem ter como alvo o sistema reprodutivo em indivíduos do sexo masculino (causando infertilidade), os rins e o aparecimento de gânglios mamários nos indivíduos do sexo feminino. Existe também conhecimento de uma possível presença de um potencial mutagénico in vitro [4,15-16,23].

Estudos baseados nas consequências a nível reprodutivo indicaram que após a ingestão de uma dada quantidade de 3-MCPD, existe a possibilidade de este atravessar a barreira sangue-cérebro e sangue-testículo e resultar consequentemente numa ampla distribuição do composto nos restantes fluídos do corpo [23].

Os ésteres de 3-MCPD possuem um grande potencial de bioacumulação no tecido adiposo, o que lhes confere a capacidade de se alojarem no mesmo e consequentemente integrarem-se em membranas celulares [24]. Segundo um artigo que estuda o comportamento da forma esterificada do composto, mesmo que os ésteres sejam preservados como monoésteres (forma mais comum observada de 3-MCPD) e forem submetidos apenas a hidrólise parcial em vários alimentos, podem constituir ainda assim um problema de saúde após digeridos [23].

## 2.2.8 Legislação e Regulamentos

Com o objectivo da protecção da saúde pública e com uma perspectiva de avaliação de risco, o artigo 2 do *Regulamento n°315/93* estipula que, quando necessário devem ser estabelecidos limites máximos de tolerância a certos contaminantes [4]. Assim, o 3-MCPD encontra-se actualmente abrangido pelo Regulamento (EC) 1881/2006, existindo por isso, um limite tolerável diário (TDI- *Tolerable daily intake*) estabelecido.

De acordo com o Comité Científico dos Alimentos da Comunidade Europeia (SCF) e o Comité Conjunto FAO/OMS de especialistas em aditivos alimentares (JECFA), o TDI médio para o 3-MCPD em HVP's e molho de soja é de 20 µg/kg por peso corporal, tendo sido implementados estes valores para toda a União Europeia (UE), ao abrigo do Regulamento (CE) n° 1881/2006 [25]. Há que ter em conta que este valor foi estabelecido para produtos que contenham cerca de 40% de matéria seca, e este deve ser ajustado para a quantidade da mesma para cada tipo de produto [3,4].

Relativamente ao TDI recomendado para a exposição ao 3-MCPD para outros tipos de categorias de alimentos, a *EFSA* estabeleceu um primeiro valor médio em 2001 de 2,0 µg/kg, passando posteriormente para 0,8 µg/kg por peso corporal, sendo este o limite que se mantém até ao presente dia. Este novo limite foi implementado para alimentos que possuam quer a configuração livre, quer a configuração esterificada do composto [26].

Existe referência com base num estudo realizado pela *EFSA* que ao longo de 2 anos (2009-2011) mais do que 64 grupos populacionais incluídos no estudo em análise estavam expostos a valores que excediam o TDI para a exposição ao 3-MCPD[25].

O TDI está também dividido em sub-categorias que se encontram disponíveis para uma generalidade de grupo alimentares adaptados a cada tipo de indivíduo. Segundo o artigo “*Scientific Opinion*” da EFSA, de Março de 2016 obteve-se os seguintes limites de referência máximos observados [4]:

*Crianças:* TDI compreendido entre 0,5-1,5 µg/kg por peso corporal, tendo sido registados valores máximos compreendidos entre 1,1-2,6 µg/kg por peso corporal;

*Adultos:* TDI compreendido entre 0,2-0,7 µg/kg por peso corporal, que se encontra abaixo do limite estabelecido.

*Bebés:* TDI máximo registado de 2,5 µg/kg.

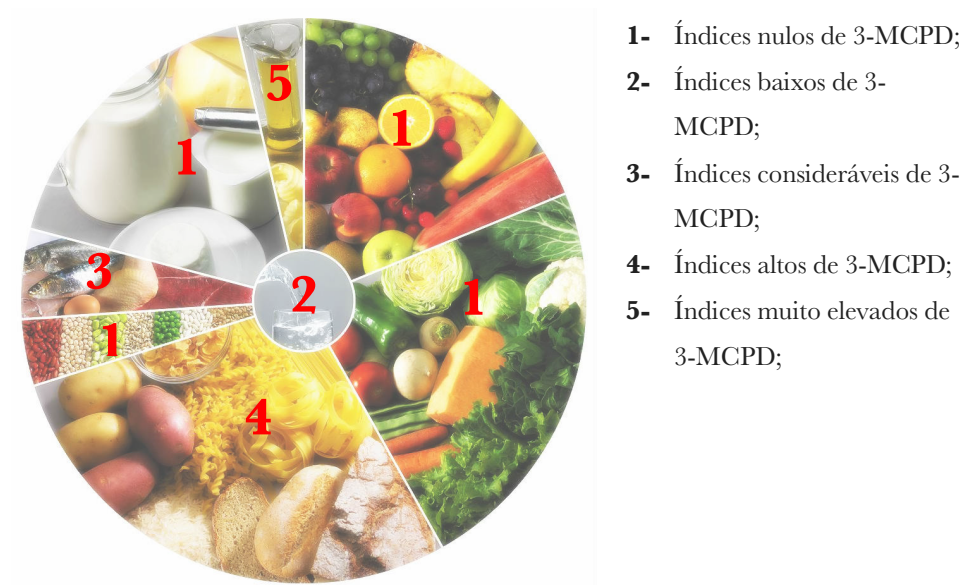
## 2.2.9 A sua presença na roda alimentar

A presença de 3-MCPD no grupo dos Óleos e Gorduras já não é novidade desde da descoberta da sua presença nas *HVP* nos anos 80. Porém, nas últimas décadas estudos levados a cabo por várias entidades científicas inseridas na indústria alimentar, têm vindo a concluir que a presença deste tipo de contaminante e dos seus ésteres tem-se tornado cada vez mais recorrente numa enorme variedade de alimentos.

O artigo *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* de Abril de 2015, sublinha que existem em particular 3 classes de alimentos contaminadas pelo 3-MCPD. A que merece maior destaque é a categoria dos “Óleos e Gorduras” seguido pelas “Comidas Termicamente Processadas” nomeadamente produtos de origem cereal, onde a exposição a temperaturas elevadas são um factor crítico para a formação do 3-MCPD. A última classe de alimentos, pertence ao grupo alimentar infantil e pré-natal onde estão incluídas as farinhas lácteas administradas aos recém-nascidos.

Estudos elaborados por o Painel da EFSA dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM), onde se analisou um total de 7175 dados de análise recolhidas a partir de 23 Estados membros da Europa, calculou vários tipos de valores relativos à quantidade de 3-MCPD[10] . Em geral, a maioria dos alimentos contêm níveis deste composto dentro dos intervalos 0,0096 a 0,0830 mg kg<sup>-1</sup>[27].

Como pode ser observado na figura 6, e no âmbito de atribuir uma noção quantitativa das quantidades presentes de 3-MCPD na roda alimentar, elaborou-se uma escala de 1 a 5, que tem como objectivo a classificação de cada parte desta mesma roda, em que 1 representa índices nulos do composto e 5, níveis muito elevados de 3-MCPD.



**Figura 6- Roda dos Alimentos, com classificação de 1 a 5 de ocorrência de níveis de 3-MCPD**

Nos pontos seguintes, serão citadas e descritas as ocorrências de níveis de 3-MCPD em produtos e ingredientes alimentares que fazem parte das diversas divisórias desta roda alimentar.

#### 2.2.9.1 Óleos e Gorduras

Este é o grupo que mais se destaca relativamente a altos níveis de 3-MCPD, daí a ter sido atribuída uma classificação de nível 5 na roda alimentar.

A descoberta do mesmo, deu-se em parte à investigação intensiva neste grupo alimentar devido à descoberta da sua presença nas gorduras *HVP* nos anos 80. Este tipo de grupo alimentar tem sido desde então, alvo de maior atenção já que ao longo do tempo tem demonstrado ser uma das grandes fontes que conferem altos níveis de 3-MCPD em certas categorias de alimentos.

Apesar da sua “má fama”, os óleos e gorduras fazem parte da dieta diária da maior parte da população e há quem dê ênfase aos benefícios do seu consumo moderado.

Em óleos vegetais, um estudo conduzido por Zelinková et al. (2006) atingiu a existência de valores de limites de detecção (LOD) para formas livres que vão desde valores inferiores a  $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$  até  $0,024 \text{ mg kg}^{-1}$ . Para formas esterificadas registaram-se valores muito mais elevados, variando de valores inferiores a 0,1 para  $2,462 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Dentro deste grupo de alimentos, irão ser analisados várias categorias das quais constam:

## ❖ Óleo de Palma

### ➤ O que é o Óleo de Palma?

Devido à importância dada a este ingrediente relativamente à temática da presença de 3-MCPD, decidiu-se dar uma maior ênfase à sua composição, produção, consumo e cultivo.

Sendo líder no sector da produção de óleos vegetais possuindo uma produção de 5 a 10 vezes maior que outras categorias de óleos e gorduras, o óleo de palma é considerado uma das matérias-primas mais utilizadas na indústria alimentar [29] .

Sendo considerado um óleo vegetal comestível, o óleo de palma é produzido a partir do fruto da palmeira, principalmente de palmeira Africana (*Elaeis guineensis*), onde a polpa pode conter até 50% de óleo.

Este tipo de óleo vegetal tem a particularidade de possuir na sua forma bruta , uma tonalidade avermelhada devido ao seu alto teor de carotenoides e à temperatura ambiente, apresenta-se em estado sólido [30].

### ➤ Qual é a sua composição?

Na sua forma bruta, o óleo de palma possui vitamina E, fitoesteróis e compostos fenólicos. Embora todos os óleos vegetais contenham vitamina E em várias quantidades e formas, o óleo de palma tem a particularidade de possuir tocotrienóis e tocoferóis (formas ativas de vitamina E) com uma elevada actividade. No entanto, o processo de refinação pode provocar alguma perda de vitamina E [30].

### ➤ Em que produtos é que o óleo de palma pode ser utilizado como ingrediente?

O óleo de palma pode ser encontrado numa grande variedade de produtos alimentares tais como óleos de cozinha, margarinas, gorduras para padaria, bolos, biscoitos, gelados e outros alimentos [30] .

Tem-se conhecimento também do seu uso para a indústria cosmética e farmacêutica.

### ➤ Quais são as suas propriedades?

Para além de contribuir para a atribuição das características organolépticas adequadas aos produtos, o óleo de palma tem também uma boa contribuição para a palatabilidade, estabilidade térmica, resistência à oxidação, textura e macieza dos produtos que constitui. Este tipo de óleo destaca-se também pela presença praticamente nula de ácidos gordos *trans*.

Actualmente não existe conhecimento de nenhuma gordura vegetal que seja naturalmente sólida à temperatura ambiente e que ofereça as mesmas características que o óleo de palma [30].

### ➤ Este tipo de óleo vegetal apresenta algum risco para a saúde?

Não existe ainda nenhuma relação directa que se possa estabelecer entre algum problema de saúde e o consumo de óleo de palma. No entanto, a presença elevada de 3-MCPD na sua composição é um factor a ter em conta já que foi provado que a formação deste tipo de contaminante neste tipo de gordura é desencadeada durante o processo de refinação do mesmo. Foi também verificado por vários tipos de fontes, que o óleo de palma tem destaque em todos os grupos alimentares (nomeadamente no grupo dos óleos e gorduras) por ser a gordura vegetal com maiores índices de 3-MCPD. Num estudo conduzido pelo Painel da EFSA (CONTAM), obteve-se um resultado conclusivo relativamente às quantidades extremas de 3-

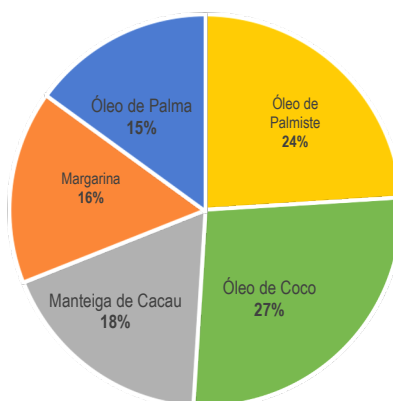


MCPD no óleo de palma, tendo-se chegado a valores de cerca de 2912 µg/kg. Estes valores são muito elevados comparativamente aos obtidos para outros tipos de óleos e gorduras como a margarina, que obteve resultados significativamente mais baixos (668 µg/kg) [31,32] .

Porém, não há nada que comprove que os níveis de 3-MCPD no produto final cujo óleo de palma é ingrediente sejam única e exclusivamente derivados do óleo de palma, podendo estar também envolvidas outros tipos de variáveis.

Há que ter uma visão alargada relativamente a esta temática e, segundo as fontes citadas deve-se considerar a dieta diária como um total, não considerando alimentos individuais. É sabido, no entanto, que uma ingestão excessiva de qualquer gordura saturada é indesejável e não recomendada e o óleo de palma não é excepção, recomendando-se por isso moderação na sua ingestão.

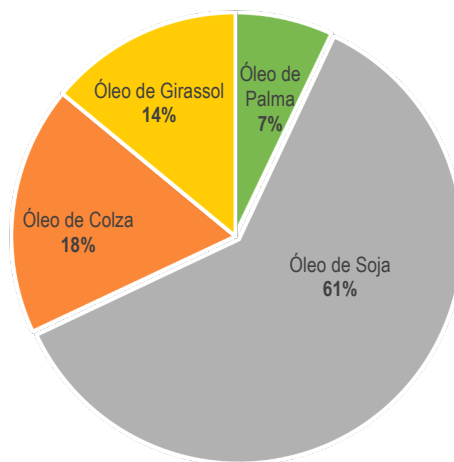
**Figura 7- Teor de gorduras saturadas de vários tipos de gorduras**



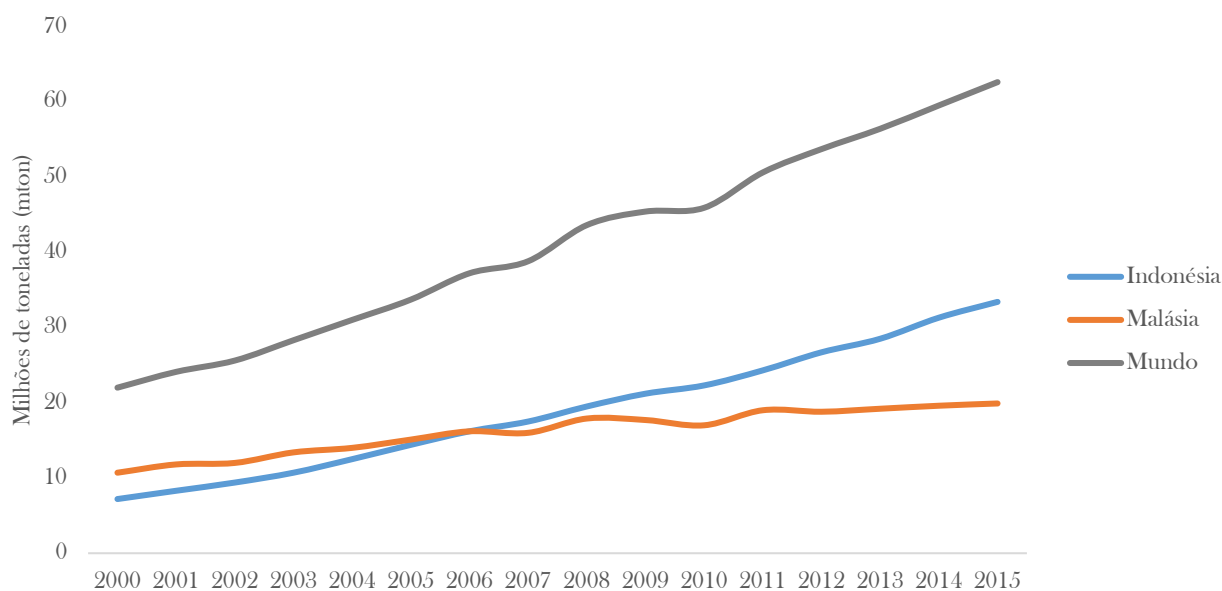
Porém, tendo em conta que o óleo de palma contém cerca de 50% de gordura saturada na sua composição, este tipo de gordura é colocada numa posição relativamente favorável aquando comparada a outros tipos de gorduras saturadas como podemos verificar na figura 7 [30].

➤ Qual é a diferença entre a produção de óleo de palma e a de outros óleos e gorduras?

Os rendimentos das culturas de óleo de palma podem ser de até dez vezes maiores do que por exemplo, de soja, de colza ou de girassol. Pode-se observar na figura 8, a percentagem ocupada por cada tipo de gordura sob a área agrícola. Devido ao bom desempenho deste óleo, este fornece cerca de 39% da produção mundial de óleo vegetal [30].

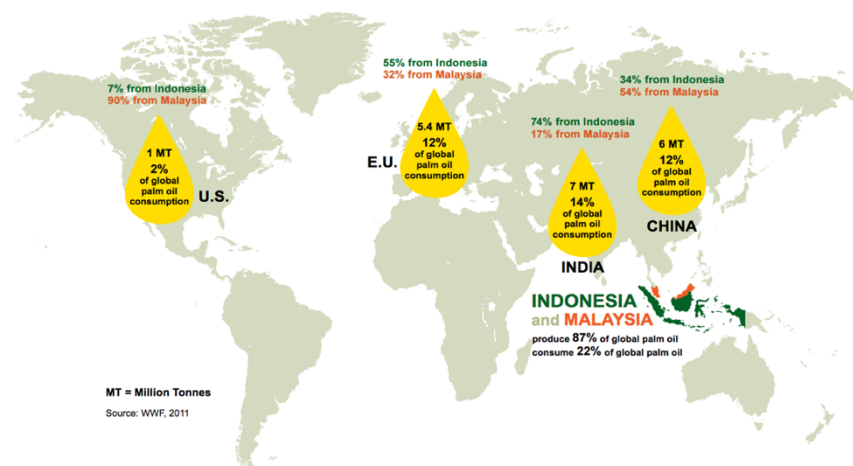


**Figura 8- Percentagem ocupada na área agrícola por cada tipo de gordura [30]**



**Figura 9-Produção mundial de óleo de palma (Oil Word 2016) [30]**

Como pode ser observado na figura 9, a produção mundial de óleo de palma aumentou. Este aumento refletiu-se na ordem das 15,2 milhões de toneladas em 1995 para as 62,6 milhões de toneladas em 2015. Este é o maior volume de produção de todos os óleos vegetais.



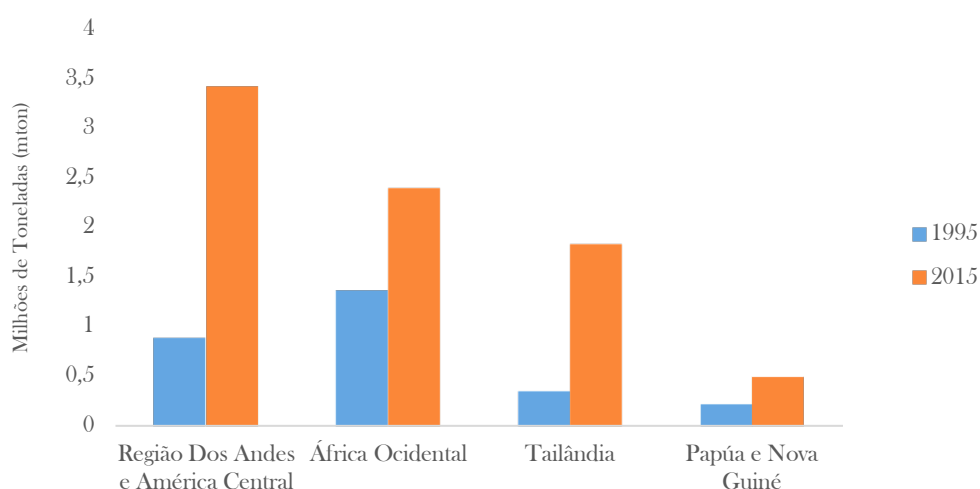
**Figura 10- Maiores Fluxos Comerciais De Óleo de Palma [29]**

Cerca de 80% de óleo de palma produzido, é utilizado na indústria alimentar por todo o mundo.

A presença de humidade é um factor essencial para o sucesso do seu cultivo e por isso, este é maioritariamente cultivado em regiões tropicais. Pela análise da figura 10, pode-se verificar que a Malásia e a Indonésia lideram os fluxos comerciais e de produção de óleo de palma. A produção deste tipo de produto é considerada vital para a economia destes países, representando cerca de 3,2% do PIB da Malásia e cerca de 7% do PIB Indonésio. (RSPO, 2011a). Estes dois países, juntos, lideram em cerca de 87% da oferta mundial de óleo de palma [30].

Já os Estados Unidos, Índia, China e a União Europeia têm destaque pelo seu grande consumo desta matéria-prima, sendo estes considerados uns dos principais mercados de consumo do mundo.

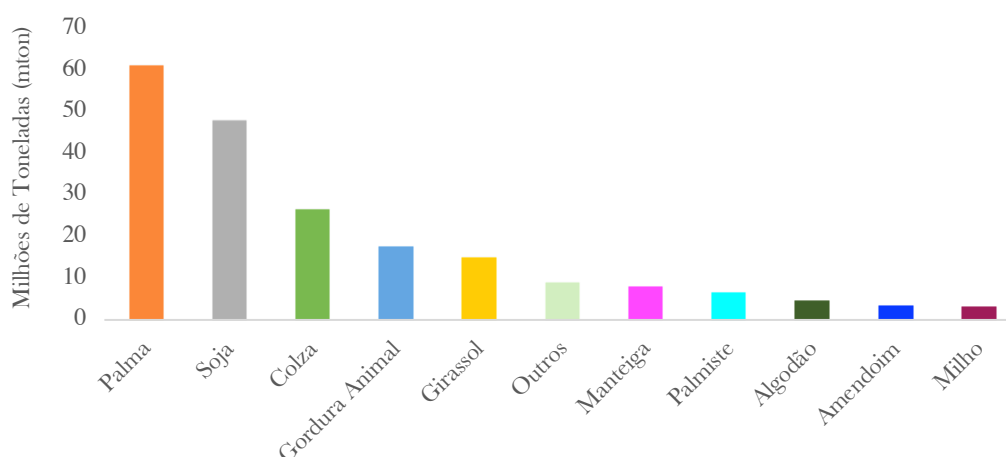
Na Europa, o óleo de palma é normalmente vendido e consumido na sua forma refinada, ou seja, depois de ser branqueado e desodorizado, no entanto, no Brasil sabe-se que este é usado na sua forma bruta, de modo a beneficiar da sua riqueza em vitamina E.



**Figura 11- Outros países/ regiões produtores de óleo de palma com maior aumento de capacidade de produção (Oil word 2016) [30]**

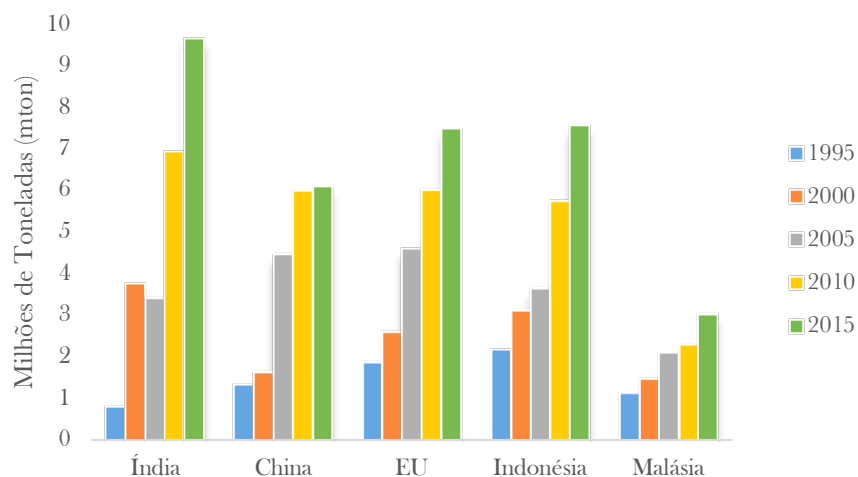
Como se pode observar pela figura 11, existe um aumento bastante significativo no decorrer destes 20 anos em todas as principais regiões centradas no cultivo da palma, sendo esse aumento mais acentuado na região da América Central.

Pela figura 12, refuta-se o facto já mencionado várias vezes nesta dissertação de que a palma é um dos óleos vegetais mais consumidos em todo mundo. Em 2015, pela análise desta fonte, foram produzidos cerca de 63 milhões de toneladas de óleo de palma.



**Figura 12- Consumo mundial de óleos e gorduras em 2015 (Oil World 2016) [30]**

Pela análise simultânea da figura 11 e 12, pode-se concluir que para o mesmo tipo de gordura existe uma relação praticamente directa entre a produção e consumo, estando ambas as variáveis bastante equiparadas.



**Figura 13- Consumo dos principais consumidores de óleo de palma ( milhões de toneladas) (Oil World 2016) [30]**

Sendo os principais consumidores de óleo de palma as regiões mencionadas na figura 13, a produção de óleo de palma bruto e a respectiva procura é satisfeita inteiramente por importações, tendo sido em 2015 a Índia, a China e a UE responsáveis por cerca de 47,9 % das importações mundiais [30].

### ➤ Certificação RSPO no Óleo de Palma

No âmbito de conjugação de um desenvolvimento sustentável com um bom rendimento, agregado ao conceito de crescimento e uso de produtos com óleo de palma de qualidade através dos padrões globais credíveis, foi desenvolvida uma certificação denominada por RSPO (*Roundtable on Sustainable Palm Oil*) que engloba um padrão de produção abrangente e que inclui o desenvolvimento de uma melhor gestão de práticas agrícolas, riscos ambientais e sociais.

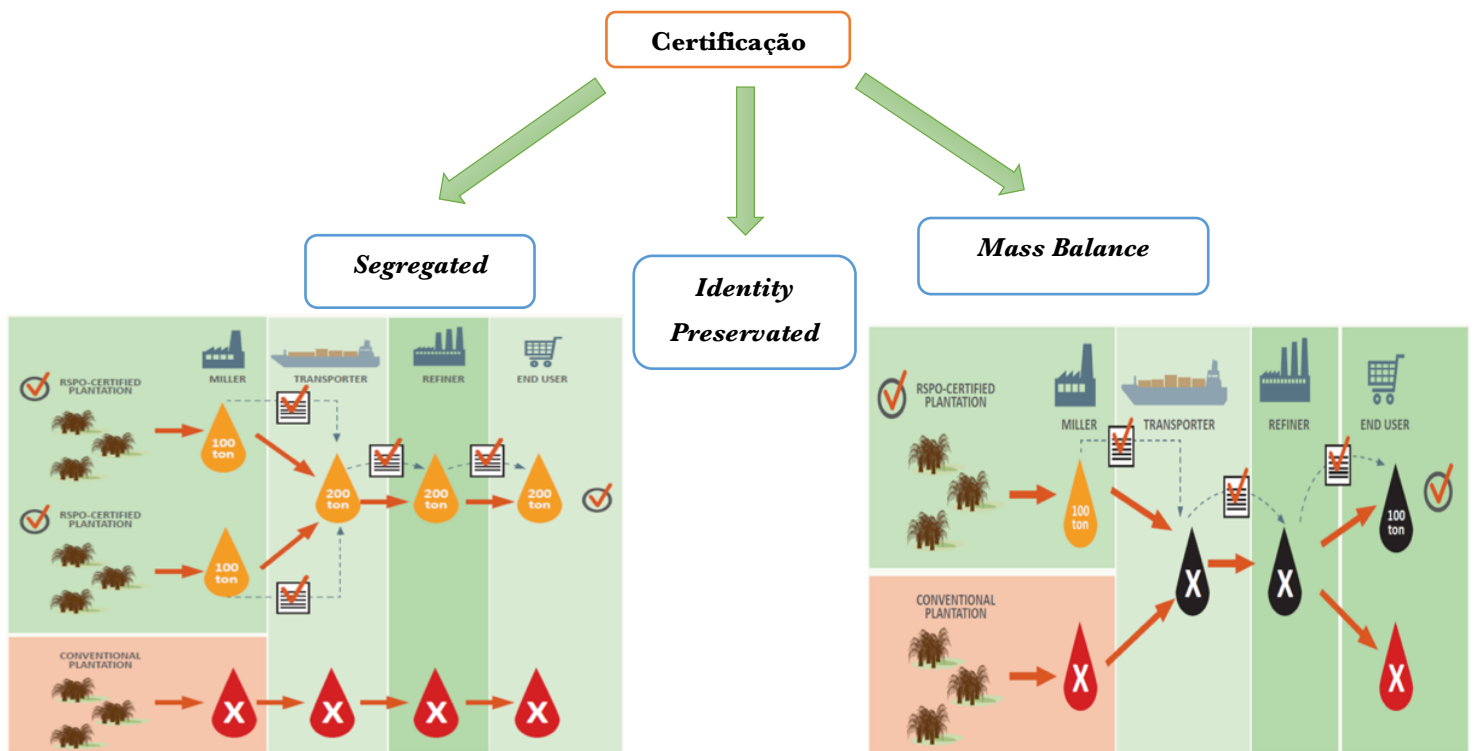
Tendo sido a certificação RSPO criada em 2004, e estando disponível no mercado em 2008, já foram certificados cerca de 1,3 milhões de hectares de plantações, o que representa aproximadamente 10% da área cultivada.

Inspirado na ideia de “mesa redonda” (*roundtable*) em que todos os membros têm direitos iguais, este sistema de Rentabilidade e Sustentabilidade na Produção de Óleo de Palma procura assim estabelecer um guia para a tomada de decisões de gestão e planeamento para os produtores e respectivos investidores face aos desafios e oportunidades dinâmicos deste tipo de sector.

Existem vários princípios na qual esta norma se rege [33] :

1. Compromisso com a transparência;
2. Conformidade com as leis aplicáveis;
3. Compromisso com a viabilidade financeira e económica de longo prazo;
4. Uso de melhores práticas de produção por produtores e processadores;
5. Responsabilidade ambiental e conservação de recursos naturais e biodiversidade;
6. Responsabilidade Social- Funcionários e comunidades afectadas pelo processamento e produção de óleo de palma;
7. Desenvolvimento Responsável de novas plantações;
8. Compromisso com a melhoria contínua das principais actividades;

O número de membros da RSPO, inclui actualmente um total de 558 membros, englobando transformadores e comerciantes, bem como fabricantes de bens de consumo e produtores (RSPO, 2011b). Este tipo de certificação envolve também a realização de uma revisão das operações de produção existentes, a identificação de áreas de incumprimento das normas, a implementação de um plano de acção para abordar essas áreas e a realização de auditorias por parte de um organismo de certificação aprovado[29] . Dentro deste tipo de certificação, existem vários tipos a considerar, como se pode observar na figura 14:

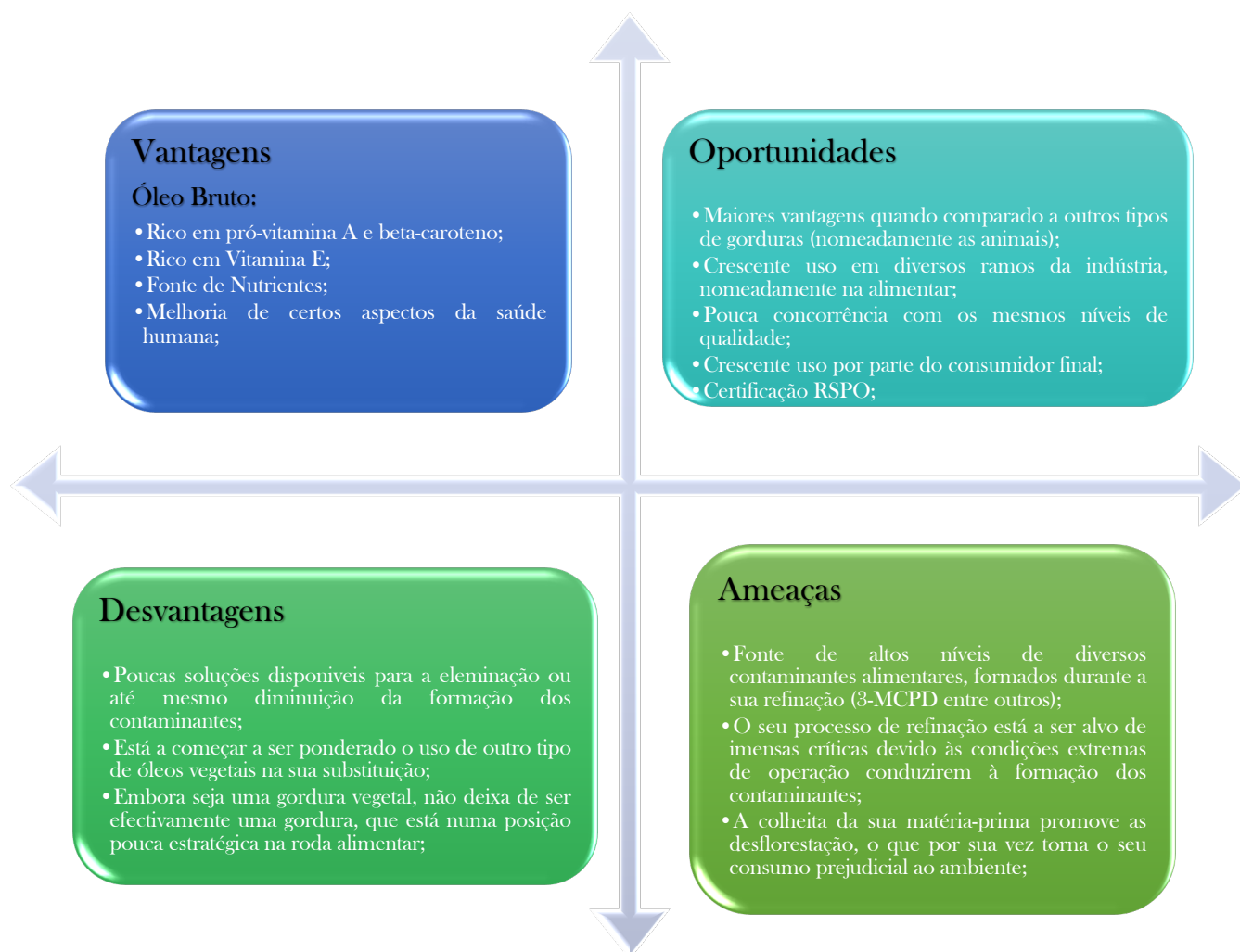


**Figura 14- Representação Esquemática Das Várias Representações RSPO[29]**

O modelo *Mass Balance* permite que o óleo de palma sustentável RSPO, possa ser misturado com óleo de palma convencional em qualquer fase do processo da cadeia de fornecimento, desde que as quantidades da empresa sejam controladas, e desde que seja executado o controlo efectivo da entrada de matéria-prima e a venda de produto acabado através de balanço mássico. Não pode por isso existir venda de produto acabado sem existir saldo positivo de matéria-prima na empresa certificada por este modelo.

O modelo *Segregated* apenas pode ser usado óleo de palma certificado pela RSPO, porém a mistura de outros óleos RSPO de diferentes origens é permitida. Dentro deste modelo existe a separação durante o armazenamento de óleo de palma RSPO e não RSPO dentro da cadeia de abastecimento, garantindo a rastreabilidade a nível de matéria-prima, de processo, armazenagem e venda de produto acabado.

No âmbito de se obter uma visão estratégica das potencialidades e respetivas fraquezas do óleo de palma, elaborou-se uma análise SWOT a esta matéria-prima, como se pode observar na figura 15.



**Figura 15- Matriz Swot do Óleo de Palma**

#### ❖ Outros Tipos de Óleos e gorduras

Da família dos óleos vegetais, o óleo de colza destaca-se pela positiva já que é um dos que regista menores valores de 3-MCPD. Os óleos de girassol e de amendoim também não apresentaram valores significativamente elevados quando comparados ao óleo de palma.

#### 2.2.9.2 Outras Tipos de Alimentos

Com base num estudo efectuado a diversos tipos de grupos alimentares, no grupo denominado “Outros alimentos”, as amostras que demonstraram maiores valores de 3-MCPD sob a forma de ésteres, foram as batatas fritas (216 µg/kg) e os produtos de pastelaria sujeitos a altas temperaturas (247 µg/kg) [4,34].

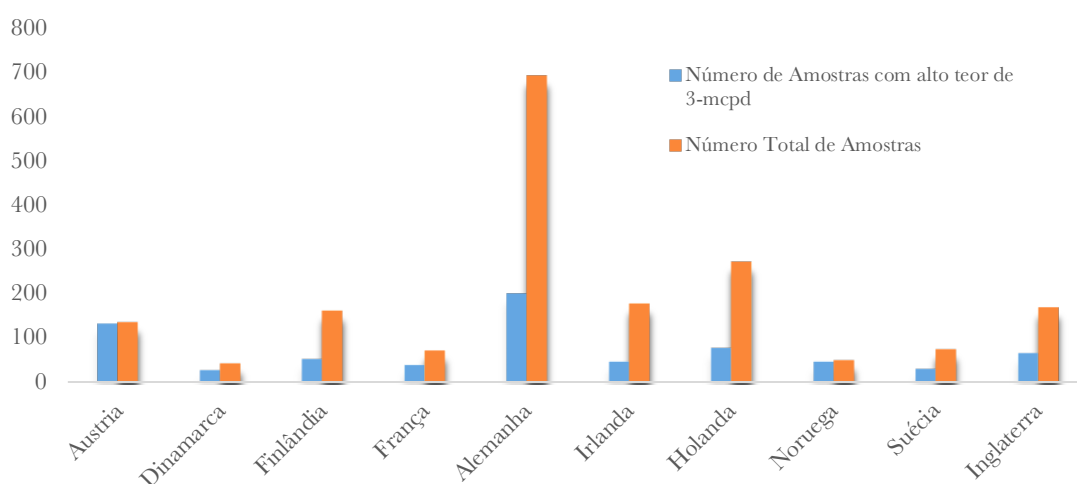
Surpreendentemente, segundo outra fonte, não houve resultados da presença do contaminante em gorduras animais como banha de porco, e noutro tipo de gorduras como a manteiga convencional e a manteiga de cacau. Pensa-se que o facto de estas gorduras não necessitarem de um processo de refinação, confere-lhes ausência de 3-MCPD e respectivos ésteres na sua composição [7,35].

#### ❖ Soja- Derivados e Molhos:

Foi verificada à semelhança do óleo de palma, a existência de altos níveis de 3-MCPD no molho de soja. A sua formação neste tipo de ingrediente alimentar dá-se por intermédio da hidrólise ácida de proteína vegetal num processo utilizado para a produção em massa de um molho de soja artificial, num mínimo período de tempo possível, sem ser necessário um processo de fermentação [6].

Foi realizado um estudo estatístico a nível Europeu, para averiguar a incidência de 3-MCPD em diversas amostras de molho de soja e respectivos derivados onde foram inquiridos 10 países com um respectivo número de amostras como se pode verificar na figura 16 [36].

Foi também efectuada uma estimativa e uma comparação da percentagem do número de amostras que demonstraram níveis altos de ésteres de 3-MCPD e o número total de amostras realizadas.



**Figura 16- Comparação da Quantidade Total de Amostras Por Cada País com Altos Níveis de 3-MCPD com a Quantidade de Amostras Totais [36]**

No âmbito da avaliação de potenciais problemas para a saúde pública na Austrália, a FSANZ realizou dois estudos em 2001 em alimentos derivados da soja.

Relativamente ao primeiro estudo, foram encontrados em alguns produtos relacionados com o molho de soja, níveis de 3-MCPD bastante elevados (cerca de 150 mg/kg). No segundo estudo, outras classes de alimentos foram avaliadas e foi concluído que os níveis de 3-MCPD eram também incidentes nas seguintes categorias:

#### ❖ Carne processada



Neste grupo alimentar a presença de 3-MCPD mesmo que em pequenas quantidades, dá-se quando estes são sujeitos a processos de grelha, defumação ou a qualquer outro tipo de processamento que envolva altas temperaturas. Devido a este factor foi atribuída da classificação de 2 valores na figura 6.

Foram registados níveis particularmente pequenos em carne picada, salsichas e presunto.

Supõe-se que a quantidade (mesmo que pequena) de 3-MCPD presente nas salsichas se dê devido à reacção que ocorre entre o cloreto de sódio e os lípidos presentes no produto.

#### ❖ Peixe

O 3-MCPD foi também observado em alimentos como o peixe (nomeadamente o salmão) quando este é sujeito a um processo de defumação ou de grelha e diversos estudos em redor desta classe alimentar têm vindo a ser efectuados [34]. À semelhança do ponto anterior, a mesma classificação na figura 6 foi atribuída.

#### ❖ Produtos provenientes da panificação e pastelaria

Produtos da indústria da panificação também foram considerados uma das grandes fontes de 3-MCPD, daí ter sido atribuída uma classificação de nível 4 na figura 6. Este facto é devido ao glicerol livre produzido pela acção das enzimas do fermento ser considerado o maior precursor para a formação do composto neste tipo de classe alimentar, seguindo uma reacção de ordem 0 [4] .

Este tipo de produtos levanta uma grande preocupação no que toca à exposição de 3-MCPD, já que embora os níveis detectados não sejam extremamente altos, este é um grupo da roda alimentar que faz parte da dieta da maior parte da população a nível mundial, abrangendo indivíduos de todas as faixas etárias.

O processo adicional de tostagem que se pode aplicar a este tipo de produtos, também é um factor que juntamente com todos os referidos anteriormente, tornam o pão e todos os seus derivados uma fonte significativa de exposição ao 3-MCPD [17] .

Dentro desta classe, segundo outro tipo de fonte, os *crackers* foram um dos alimentos que apresentou uma taxa maior do contaminante (130 µg/kg). Segundo a mesma fonte, dentro da indústria da panificação, foi verificado que amostras cuja farinha de trigo era usada como ingrediente, apresentavam valores mais elevados de 3-MCPD, o que leva a crer que produtos de origem deste tipo de cereal juntamente com uma fonte de calor, possa ser precursor da formação do 3-MCPD [18].

Nos produtos provenientes da indústria pasteleira, no âmbito de reduzir os altos níveis de 3-MCPD registados, recorre-se normalmente à diminuição do pH das matérias-primas, porém, esta tentativa resultou no aumento de outro contaminante muito recorrente na indústria alimentar: a acrilamida [15] .

#### ❖ Água Mineral

Existe referência também da presença de 3-MCPD em água mineralizada tratada com epíclorodrina/co polímeros de amina usados como floculantes ou auxiliares de coagulantes [2] . A presença de 3-MCPD dá-se com a reacção da epícloridrina com a molécula de água, como referido anteriormente.

Porém não existem estudos aprofundados da presença deste contaminante na água que comprovem altos níveis presentes, daí a atribuição de nível 2 na figura 6.

#### ❖ Farinhas Lácteas para Recém-Nascidos

O Instituto Federal de Avaliação dos Riscos (BFR) na Alemanha afirmou que estas classes de alimentos contêm na sua formulação óleos vegetais e por vezes óleos animais, o que lhes confere um teor de gordura de cerca de 25%[9,18]. Este teor de gordura é um factor determinante na formação do composto neste tipo grupo alimentar, tendo sido encontrados altos níveis da forma esterificada e livre de 3-MCPD.

Foram encontrados ingredientes tais como óleo de palma e de palmiste em diversas amostras analisadas, que como já foi referido anteriormente, são fontes principais de ésteres de 3-MCPD [6,37-38].

Estima-se que a faixa etária dos bebés e recém-nascidos que incluem suplementos à base de farinhas lácteas na sua alimentação, ingeriam diariamente cerca de 2,4 µg/kg por peso corporal, um valor bastante mais elevado que o TDI em vigor.

#### ❖ Caldos em Cubo, Sopas e molhos mistos

Existe referência do crescimento de 3-MPCD em muitos alimentos processados e ingredientes de sopas, snacks condimentados, molhos mistos e caldos em cubo [39] .

### 2.2.10 Análise de Risco à Exposição do Composto- Faixas Etárias

De acordo com a AESA e o BFR, os grupos mais expostos a altos níveis do composto são as crianças e jovens (até 10 anos) , sendo o grupo alimentar que mais contribui para este factor são as gorduras vegetais, biscoitos, produtos de pastelaria e bolos [7].

Foi dado também especial ênfase a crianças não-amamentadas que são alimentados exclusivamente com farinhas lácteas infantis produzidas industrialmente [3,40].

Porém, dada a ausência quer de alternativas quer de indícios de danos à saúde humana, o BFR recomenda que os pais continuem a usar as farinhas lácteas infantis até que o contrário se prove [7].

Na classe dos adultos foram as batatas fritas e a carne sujeita a processos como a fritura ou a defumação que mais contribuíram para a exposição excessiva aos altos níveis de 3-MCPD. No entanto, os valores verificados não justificam uma intervenção urgente na mudança de hábitos alimentares, pelo que a única recomendação que é dada por parte das entidades responsáveis é que se mantenha uma alimentação saudável e equilibrada, evitando o consumo de alimentos ricos em óleos e gorduras, que consequentemente causa uma menor exposição ao composto na sua forma esterificada [9] .

### 2.2.11 Estabilidade do Composto

O 3-MCPD apresenta uma grande instabilidade em meios alcalinos, e foi provado que com valores de pH a excederem as 6 unidades, verifica-se uma presença de carboidratos que inibem a formação do mesmo[3,41].

A degradação do composto é altamente influenciada não só pelo pH, mas também pela temperatura, sendo que a reacção de degradação obedece normalmente a uma dependência da temperatura segundo a Lei de Arrhenius:

$$k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}}$$

### Equação 2- Lei de Arrhenius

onde:

$k$  = Constante cinética de velocidade;

$A$  = Constante pré – exponencial;

$Ea$  = Energia de Activação;

$R$  = Constante dos gases ;

$T$  = Temperatura;

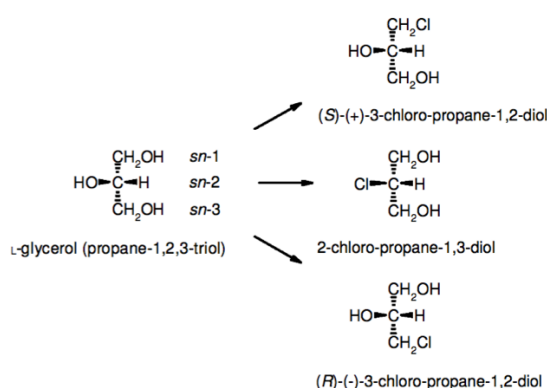
A equação também pode ser escrita como logaritmo neperiano:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{Ea}{R} \times \frac{1}{T}$$

### Equação 3-Lei de Arrhenius escrita por logaritmo neperiano

A energia de activação correspondente à degradação do 3-MCPD registada correspondeu a um valor de 119,2 kJ mol<sup>-1</sup> ao longo de uma gama de pH de 5 ± 9 e de temperaturas entre os 25 e os 85°C em modelos aquosos [2].

Este mecanismo é normalmente aproveitado pelos produtores de óleos e gorduras para a diminuição dos ácidos HVP, como se pode verificar na figura seguinte:



**Figura 17- Isómeros de Monocloropropanediol e a sua relação com o L-Glicerol numa projecção de Fisher [2]**

No entanto, a degradação dos vários tipos de monoclopropanóis não é equivalente. Por exemplo, foram obtidos valores de constantes cinéticas ( $k$ ) diferentes para o 3-MCPD e para o 2-MCPD dentro das condições acima obtidas tendo sido obtidos valores de  $9,79 \times 10^{-3}$  (s<sup>-1</sup>) e  $7,60 \times 10^{-4}$  (s<sup>-1</sup>) respectivamente.

#### 2.2.12 Cinética

A cinética entre a relação de formação do 3-MCPD com o seu precursor de glicerol foi determinada a temperaturas entre 100 e 230 ° C em misturas de reacção que simulam as camadas superficiais de alimentos processados. Segundo um estudo elaborado pela EFSA, onde se efectuou uma investigação relativa à

presença do composto numa vasta gama de alimentos, a constante de velocidade de decomposição ( $K_2$ ) de 3-MCPD foi calculada seguindo uma cinética de ordem 1 a partir da seguinte equação [11]:

$$c_{3-MCPD} = c_{(3-MCPD)0} \times (e^{-k_2 \times t})$$

**Equação 4- Concentração de 3-MCPD segundo a taxa de concentração inicial**

onde:

- $k_2$  ( $s^{-1}$ ) é a constante cinética relativa à taxa de decomposição de 3-MCPD em segundos;
- $c_{(3-MCPD)0}$  é a concentração inicial de 3-MCPD;

Usando a equação seguinte temos que:

$$c_{3-MCPD} = c_{glicerol} \times \frac{k_1}{k_2 \times k_1} \times (e^{-k_1 \times t} - e^{-k_2 \times t})$$

**Equação 5- Concentração de 3-MCPD segundo a taxa de concentração de glicerol**

onde:

- $k_1$  ( $s^{-1}$ ) é a constante cinética relativa à taxa de formação de 3-MCPD com glicerol, em segundos;
- $k_2$  ( $s^{-1}$ ) é a constante cinética relativa à taxa de decomposição de 3-MCPD em segundos;
- $c_{glicerol}$  é a taxa de concentração inicial do glicerol;

Na tabela 2 podem ser verificadas constantes cinéticas para a decomposição do 3-MCPD e para a formação de glicerol em vários intervalos de temperaturas:

**Tabela 2-- Constantes Cinéticas e Respetivas Temperaturas [11]**

<b><i>Temperaturas (°C) Camadas Superficiais em Alimentos Processados</i></b>	<b><i><math>k_1(s^{-1}) \times 10^{12}</math> (Formação)</i></b>	<b><i><math>k_1(s^{-1}) \times 10^{12}</math> (Decomposição)</i></b>
<b>230</b>	3770	9.9
<b>200</b>	1120	3.7
<b>170</b>	281	3.5
<b>140</b>	147	2.6
<b>100</b>	7.19	1.9

É importante referir que neste estudo, foi obtido um valor de energia de activação igual ao referido no ponto 2.2.11.

### 2.2.13 Formação de 3-MCPD no Fabrico de Óleos e Gorduras Vegetais

Sabe-se que a fonte principal de formação de 3-MCPD concentra-se essencialmente na industria de Óleos e Gorduras vegetais que, posteriormente servem de intermediários para outro tipo de alimentos.

De facto, parece que alguns óleos têm uma maior tendência para formar ésteres de 3-MCPD e ésteres glicídicos e a razão para que tal ocorra, está ainda para ser compreendida [42].

De acordo com a FEDIOL (Associação do óleo vegetal da UE) vários fatores podem influenciar a subida dos níveis do composto [7] :

- Maior ocorrência natural de substâncias que servem como precursores de MCPD e ésteres de ácidos gordos glicídicos em frutos de palmeiras,
- Maturação da fruta de palma que está em processo de colheita;
- Tempo entre a colheita e o processamento;
- Condições de transporte;

Existem dados que indicam que menores níveis de 3-MCPD estão presentes no óleo de palma proveniente da Malásia comparativamente com óleos processados fora desse país.

Tal facto pode estar associado ao processo de fabrico ou talvez por factores associados aos pontos mencionados acima, contudo não existe nenhuma relação directa para tal ocorrer [32] . Porém, já foi descoberto que é durante uma etapa da sua refinação que a formação da forma esterificada de ácidos gordos do composto ocorre com maior impacto.

#### 2.2.13.1 Etapa de Refinação de Óleos e Gorduras

O processo de refinação tem como principal objectivo a eliminação de impurezas como ácidos gordos livres (FFA), fosfolípidos, produtos de oxidação, pigmentos e vestígios metálicos dos diferentes óleos e pode-se dividir em dois processos:

##### ❖ Processo Químico

No processo químico, os ácidos gordos livres são neutralizados por uma base (Soda Caustica) dando origem a um sabão que é removido por separação de fases. Para além de ser considerado um processo dispendioso onde existem perdas de óleo na ordem dos 30%, existe um consumo excessivo de energia que pode prejudicar o meio ambiente. Este tipo de processo é normalmente aplicado a óleos insaturados com alto teor de fosfatídeos. Sofrem este tipo de tratamento óleos como o de colza, amendoim e de soja.

##### ❖ Processo Físico

O processo físico tem como base a remoção dos compostos indesejáveis por destilação através de um processo baseado numa grande diferença de volatilidades. O vapor é usado para remover os FFA durante a desodorização e consequentemente conduzir à diminuição da quantidade de produtos químicos que são inevitavelmente aplicados.

Neste tipo de processo, as perdas de óleo são significativamente inferiores quando comparada à refinação química. No entanto, para além de impurezas, alguns componentes valiosos, tais como carotenoides e fito esteróis também são indesejavelmente retirados [42] .

No caso do óleo de palma, já foi verificado que é na etapa de desodorização que o 3-MCPD se forma, já que é nesta etapa que as temperaturas mais altas se registam (200°C) , proporcionando uma boa cor, odor e baixo teor de ácidos gordos nos óleos, de modo a corresponder às exigências do consumidor [4,43].

### 2.2.13.2 Diminuição dos níveis de 3-MCPD por Parte dos Fabricantes

Existem esforços por parte de várias entidades produtoras em tentar reduzir os altos níveis de 3-MCPD nesta categoria de óleos. No caso do óleo de palma, tem-se vindo a adicionar uma etapa processual onde o óleo bruto é lavado com uma solução aquosa de etanol antes da desodorização. Esta etapa levou a uma redução de cerca de 30% dos níveis de 3-MCPD, sendo que a adição de apenas 1% de etanol no óleo antes da mesma etapa, resultou na redução dos níveis do composto em cerca de 25 a 35%.

A FEDIOL refere que durante o período de 2010 a 2015 foi alcançada uma redução de 50% de ésteres glicídicos em HVP [26] .

Embora seja tecnicamente possível a redução dos níveis de 3-MCPD para abaixo dos  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , estas alterações aos processos não garantem a total conservação da qualidade do óleo e podem representar alguns riscos para a saúde do consumidor [5].

Existe também um investimento associado a nível de maquinaria e equipamentos, que é considerado pelos fabricantes um investimento de capital demasiado dispendioso e desnecessário devido a todas as limitações a que está associado [32] .

Segundo a mesma fonte, não existe até actualidade conhecimento da viabilidade do processo de redução de 3-MCPD dos óleos e gorduras vegetais sem ter por em risco outros parâmetros como a segurança e a qualidade. Existe o receio de que ocorram efeitos colaterais indesejáveis como por exemplo poluição do meio ambiente e a alteração das propriedades organoléticas do produto.

Para além do desconhecimento relativo aos custos operacionais e do capital necessário em concreto, existem parâmetros que têm que ser mantidos, como a funcionalidade completa do processo e o prazo de validade do produto. Estes factores não podem nem devem ser de maneira alguma desprezados pois correm o risco de ocorrência de uma grande variabilidade ao longo do processo de diminuição do 3-MCPD [26] .

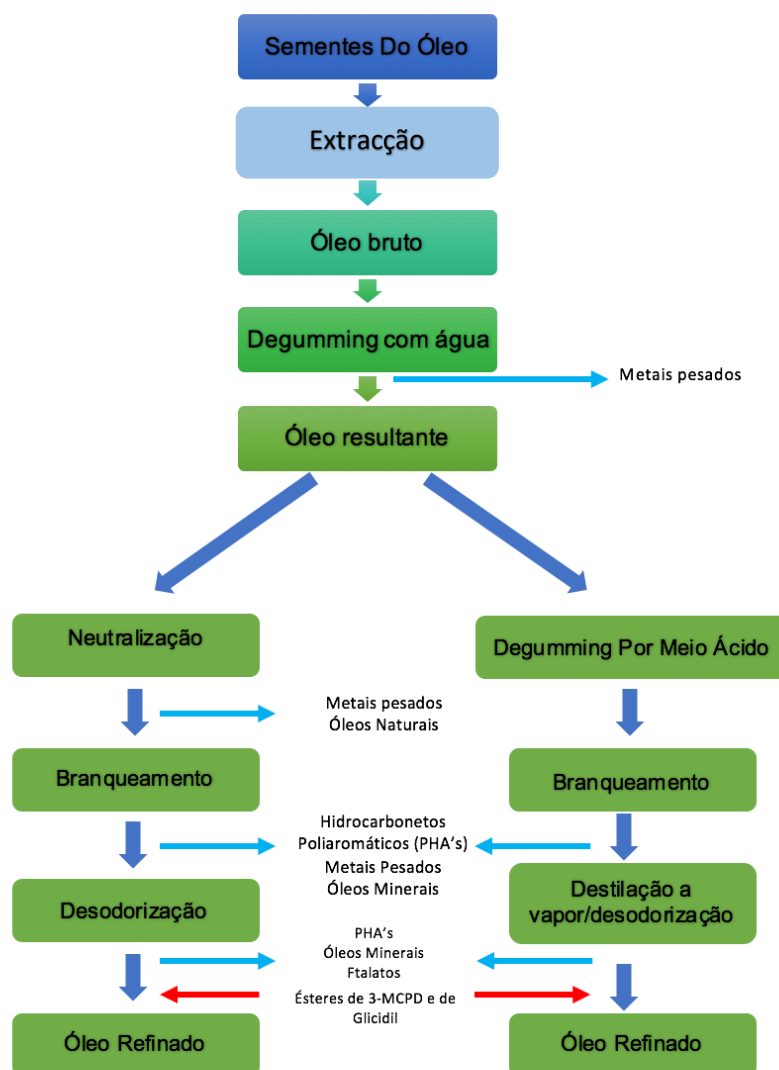
Apesar de todos os contras que as implementações de medidas de redução podem apresentar, têm que ser estabelecidas soluções. Em 2012, o *Codex Alimentarius* publicou um código prático cujo objectivo era a diminuição da formação do 3-MCPD durante a hidrólise de proteínas vegetais em produtos com gordura de origem vegetal, onde os factores controlados eram a temperatura e o tempo de aquecimento.

Também se testou a hipótese de lavagem da polpa da fruta de palma, que produziu uma redução de cerca de 95% dos di-ésteres de 3-MCPD.

Existe também a referência de que o Japão é o país que investe mais na investigação da redução do composto em ácidos de HVP [15] .

Em certos países como o Brasil, o óleo de palma é usado na sua forma bruta (ou seja, sem passar por qualquer tipo de refinação), já que o óleo puro possui uma concentração muito elevada de vitamina A que consideram essencial para o desenvolvimento fetal. Porém, sabe-se que cerca 95% de todos os óleos e gorduras vegetais são sujeitos a processos de refinação [7].

As etapas de processamento deste tipo de óleo, encontram-se esquematizadas na figura 18.



**Figura 18- Etapas de Processamento do Óleo de Palma [44].**

#### 2.2.14 3-MCPD pela Europa

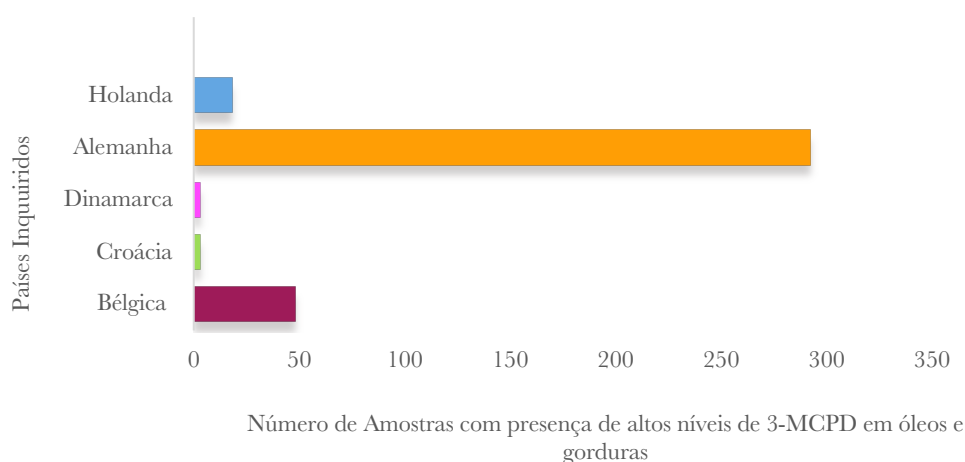
Na Europa, estima-se que na indústria de óleos e gorduras vegetais refinados foram processados cerca de 7 milhões de toneladas de óleos vegetais brutos a partir de sementes oleaginosas, essencialmente de colza, sementes de girassol e de soja (os chamados "óleos leves"). Além disso, cerca de 6 milhões de toneladas de óleos tropicais na sua forma bruta, incluindo o óleo de palma, óleo de palmiste e óleo de coco, também foram refinados em refinarias situadas na UE. Em toda a Europa, existem cerca de 100 plantações que são propriedade de cerca de 60 empresas, estão a processar "óleos leves" e / ou óleos tropicais [43].

### 2.2.14.1 Países mais intervenientes no controlo e detecção de 3-MCPD

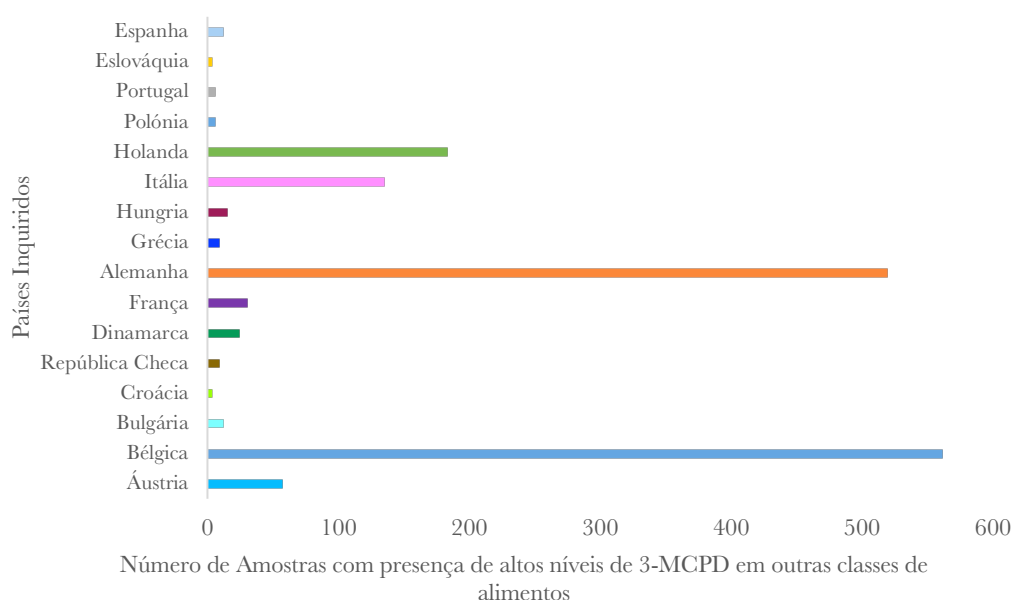
A nível estatístico, a Alemanha é um dos países, que tem demonstrado mais interesse no controlo dos níveis de 3-MCPD numa mais ampla gama de alimentos, como se pode verificar nas figuras 19 e 20.

Existe conhecimento de que várias entidades alemãs estão envolvidas no estudo do comportamento do 3-MCPD, tendo sido ao longo do tempo desenvolvidas várias acções de prevenção de formação do contaminante por estas mesmas entidades.

O Instituto de Química de Alimentos da Associação da Indústria de Confeitaria Alemã, por exemplo, está intensamente envolvido nos projetos de minimização do composto, sendo esta redução maioritariamente conduzida pelo setor alimentar alemão [7] .



**Figura 19- Países com maiores índices de 3-MCPD registados em Gorduras e Óleos [7]**



**Figura 20- Países com maiores índices de 3-MCPD registados noutras Classes de Alimentos [7]**



### ❖ Alemanha e Bélgica

Em dezembro de 2007, o Centro de Investigação Química e Veterinária (CVUA) de Estugarda e do Max Rubner-Institut (MRI) publicaram os resultados da análise relativa ao 3-MCPD, onde foram estudadas amostras correspondentes a vários óleos e gorduras comestíveis e, assim, se iniciou o debate sobre o 3-MCPD na Alemanha [45] .

Assim ao longo dos anos, têm sido desenvolvidas várias investigações dirigidas pelo Instituto de Pesquisa Alemão (FEI), que está de momento a liderar um projecto baseado no estudo do mecanismo e formação do composto [46].

### ❖ Reino Unido

Algumas das pesquisas realizadas no Reino Unido cobriram uma gama de alimentos comuns e ingredientes alimentares, enquanto que outras têm-se focado especificamente sobre diversos molhos (soja, ostras e outros) [47] .

Segundo a *Food Standards Agency 2001* foi realizado um estudo baseado nos molhos de soja onde se concluiu que cerca de 22% das amostras analisadas apresentavam valores acima dos níveis máximos estipulados [39].

Desde 1997, o Comité Consultivo dos Alimentos do Reino Unido recomendou que todas as indústrias inseridas no ramo alimentar tomassem medidas para garantir que o 3-MCPD é indetetável em alimentos ou ingredientes alimentares a um nível de 0,01 ppm.

Foi inclusive o comité de mutagenicidade do Reino Unido que confirmou que o 3-MCPD poderia ser um agente carcinogénico não genotóxico [48] .

## 2.2.15 3-MCPD pelo Mundo

Não é só na Europa que se tem vindo a gerar preocupação à volta da formação de 3-MCPD e das suas possíveis consequências.

Um pouco por todo o mundo, principalmente mais em redor dos países desenvolvidos e das grandes potências mundiais, já se tem registado algum critério na pesquisa em relação à formação e presença do composto.

### ❖ Austrália e Nova Zelândia

Embora seja um assunto ainda pouco conhecido e relatado, já existe um esforço por parte destes dois países em aprofundar os seus conhecimentos relativos ao comportamento do 3-MCPD, de modo a poder actuar em função da redução do mesmo.

Segundo um artigo da *Food Standards Australia New Zealand 2013*, existe uma análise de risco para a saúde e segurança pública com base em resultados de inquéritos elaborados na Austrália entre 2001 e 2002. Neste mesmo intervalo de tempo também foi realizada uma avaliação toxicológica do impacto deste tipo de compostos sobre a saúde pública pelo FAO/OMS e pela JECFA onde se chegou à conclusão que em relação à exposição da classe de cloropropanóis em geral nos alimentos foram implementadas medidas

regulatórias adequadas que estão agora em vigor quer na Austrália quer na Nova Zelândia no âmbito de proteger os consumidores de níveis elevados deste tipo de compostos [49] .

#### ❖ Canadá

Durante o ano 2000, a Agência Canadiense de Inspeção de Alimentos tentou agir na redução dos níveis de 3-MCPD em algumas marcas de molhos de soja, ostra e outros molhos de estilo oriental vendidos no Canadá.

Era neste tipo de grupo alimentar que a preocupação na altura mais se incidia, já que as pesquisas feitas indicavam uma maior tendência de formação em produtos de origem vegetal [50] .

#### ❖ China- Hong Kong

Em Hong Kong os estudos baseiam-se mais em alimentos derivados da soja e das ostras, já que neste tipo de país, são alimentos que ocupam uma boa posição na dieta dos seus respectivos consumidores.

#### ❖ Japão

Talvez devido à grande densidade populacional, o Japão é referido como um dos países mais preocupado na investigação direccionada à redução da formação de 3-MCPD em HVP [15] .

#### ❖ Portugal

Em Portugal, segundo o relatório final de uma auditoria realizada no país entre 29 de Abril e 8 de Maio de 2013 da Comissão Europeia da Direcção-Geral dos Consumidores, no âmbito de avaliar os controlos para os contaminantes nas várias categorias alimentares, não existem métodos analíticos acreditados pelos laboratórios da ASAE disponíveis para a análise de 3-MCPD[35] .

Embora a existência deste contaminante numa grande variedade de alimentos seja do conhecimento das autoridades para a segurança alimentar portuguesas, ainda não existe um controlo rigoroso na detecção e análise do mesmo.

### 2.2.16 Métodos Analíticos

Relativamente ao tipo de análises laboratoriais que podem ser feitas ao composto, a bibliografia refere que existem dois tipos de métodos que podem ser utilizados, os métodos diretos e os indiretos.

Os métodos de análise aplicados aos óleos e extratos lipídicos de alimentos têm sido baseados em transesterificação (no âmbito de libertar o 3-MCPD), na determinação por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (métodos indiretos) e por espectrometria de massa /cromatografia líquida de alta eficiência (métodos diretos).

A evolução e desempenho dos diferentes métodos e as suas vantagens e desvantagens são também descritas. Uma compreensão clara da química dos métodos é por isso, um factor importante a ter em conta na escolha da aplicação mais adequada já que pode e muito contribuir para a redução dos níveis destes cloropropanóis.

### 2.2.16.1 Métodos Indirectos

Na prática, são métodos que permitem a quantificação dos ésteres após a sua conversão para a forma livre do composto, sendo depois traduzidos como a soma de 3-MCPD ou de glicidol [43] . Até à data, vários métodos indirectos têm sido desenvolvidos para a análise de 3-MCPD. O protocolo de análise destes métodos compreende uma série uniforme de passos:

- **Adição de um padrão interno** (ou na forma livre ou esterificada do composto) à amostra;
- **Clivagem:** Onde existe a transesterificação (vulgarmente realizada em meio ácido ou alcalino);
- **Neutralização:** Da mistura de reacção e correspondentes trocas salinas (utilizando diferentes reagentes de neutralização e sais);
- **Derivatização:** Do 3-MCPD clivado;
- **Análise** de GC/MS;

#### ❖ Clivagem:

A determinação indirecta do composto em óleos ou extractos lipídicos começa com a clivagem dos seus ésteres. O 3- MCPD livre pode ser libertado enzimaticamente (Lugar e Sadd 2004), mas a maioria dos métodos incluem uma via química, utilizando um passo de transesterificação.

A transesterificação na presença de metanol (metanólise) resulta na conversão de TAG's e acilgliceróis parciais em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMEs) e glicerol. Simultaneamente, ésteres de 3- e 2-MCPD são convertidos para libertar as suas formas livres.

O passo de transesterificação pode ser conduzido tanto em meio ácido (Divinova et al., 2004) como em meio alcalino (2008 Weisshaar). Este tipo de transesterificação é vantajoso já que é de curta duração (com tempos de reacção compreendidos no intervalo de 5 a 10 minutos). No entanto, possui a desvantagem de o composto ser altamente instável em meio alcalino, o que provoca a formação do glicidol.

No entanto, com o objectivo de eliminar problemas relacionados com a conversão do composto em compostos indesejados como o glicidol, Kuhlmann (2011a) propôs a realização de um tipo de transesterificação catalisada por meio alcalino a uma temperatura abaixo de -22 °C, o que resultou numa recuperação mais elevada do composto, durante um período de tempo mais prolongado (cerca de 18h).

#### ❖ Neutralização

Este passo tem como objectivo facilitar a extracção de compostos lipófilos (FAMEs) a partir da mistura de transesterificado.

Os agentes para as trocas salinas mais comuns utilizados na análise de 3-MCPD são o cloreto de sódio e sais de sulfato e de brometo de sódio (Divinova et al 2004;. Weisshaar 2008; Hrnč IR i K et al, 2011; Kuhlmann 2011a) [35] .

Posteriormente, estes são adicionados à mistura de reacção após, ou durante a reacção, sendo esta etapa considerada crítica no que toca à especificidade dos métodos.

Em 2008, a especificidade de um método recém-desenvolvido com base em catálise alcalina e salga por cloreto de sódio (Weisshaar 2008) foi questionada pela demonstração de que o teor de ésteres de 3-MCPD foi superestimada em algumas amostras devido ao a formação adicional de 3-MCPD durante a preparação da amostra (Kuhlmann 2008). Esta descoberta tornou-se a base para uma nova tentativa no desenvolvimento de um novo método para a estimativa indirecta do nível de ésteres de glicidol em óleos.

Hrciri K et al. (2011) demonstraram que modificando o pH durante a salga, a conversão do glicidol pode variar exponencialmente. Embora seja limitada em soluções neutras, foi consideravelmente mais elevada a valores de pH iguais a 2. Assim, ao monitorizar o pH das misturas neutralizadas que resultam da aplicação de diferentes métodos, regista-se uma variação exponencial dos valores de pH.

Ao contrário dos métodos que se baseiam na transesterificação alcalina, os que utilizam meio ácido não são afectados por variações nas condições durante o processo de salga (Hrciri K et al. 2011).

#### ❖ *Derivatização e Análise:*

Devido à baixa volatilidade e alta polaridade do 3-MCPD, é preferível que o processo de derivatização ocorra antes da análise por cromatografia gasosa, já que conduz a uma melhoria da sensibilidade através da formação de um composto derivado do 3-MCPD considerado muito volátil, permitindo a monitorização de iões de um fragmento específico deste.

O agente de derivação mais comum usado é BPA (Ácido fenilbórico), seguido por HFBI (Heptafluorobutilimidazol) e ambos representam boas alternativas para a derivatização [6] .

Também existe conhecimento do uso de outro tipo de agentes derivatizantes como HFBA ( ácido Heptafluorobutírico anidro), TSIM (1-(trimetilsilil)imidazol), MSTFA (N-metil- N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) e o BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida) [50,51] .

Existem vários estudos que demonstram o uso dos vários agentes derivatizantes e as vantagens e desvantagens de cada um, sendo que o que diferencia cada um deles é o seu preço e sensibilidade de resultados posteriormente á análise por cromatografia gasosa.

Diferentes combinações dos passos analíticos descritos acima, e também modificações adicionais para cada etapa individual levou ao desenvolvimento de uma série de métodos. A tabela que se segue, fornece uma visão geral e uma descrição básica dos métodos indirectos mais comuns que foram publicados até à data.

**Tabela 3-Métodos Analíticos Indirectos para a análise de MCPD e ésteres glicídicos [35]**

Denominação do Método	Composto analisado	Amostra Standart	Agente de Transesterificação	Tempo de Transesterificação (h)	Agente de Derivatização
Ácido	Ésteres de 3-MCPD	PP-3-MCPD-d5	Ácido Sulfúrico / Metanol	16	PBA
Ácido	Ésteres de 3-MCPD	P-3-MCPD-d5	Ácido Sulfúrico / Metanol	16	PBA/HFBI
Ácido	Ésteres de 2 e 3-MCPD e de glicidil	PP-3-MCPD-d5 e Glicidil-P-d5	Ácido Sulfúrico / Metanol	16	PBA
Enzimático ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Ésteres de 3 e 2-MCPD	5-alfa-Colesteno	Lipase	24	HFBI
Enzimático ( <i>Candida rugosa</i> )	Ésteres de glicidil e 3-MCPD	3-MCPD-d5, 3-MBPD-d5	Lipase	0,5	PBA
Alcalino- Não específico (DGF C-III 18 (09) A)	Soma dos ésteres de glicidil e 3-MCPD	3-MCPD-d5	Metóxido/ Metanol	0,08- 0,17	PBA
Alcalino- Não específico (DGF C-VI 17 (10))	Ésteres de 3-MCPD	3-MCPD-d5	Metóxido/ Metanol	0,08- 0,18	PBA
Alcalino- Não específico (DGF C-III 18 (09) B)	Ésteres de 3-MCPD	3-MCPD-d5	Metóxido/ Metanol	0,05-0,08	PBA
Alcalino- (SGS)	Ésteres de 2 e 3-MCPD e de glicidil	3-MCPD-d5, 3-MBPD-d5	Óxido de Sódio /Metanol	18	PBA

❖ Métodos baseados na hidrólise enzimática

Uma alternativa para a transesterificação catalisada por ácido, é a clivagem enzimática de ésteres de 3-MCPD. Lugar e Sadd (2004) aplicaram hidrólise catalisada por lipase de *Aspergillus oryzae* de ésteres 3-MCPD durante um período de 24 h de incubação a pH neutro. Juntamente com a derivatização por HFBI e subsequente análise por GC/MS, o método foi utilizado para a determinação de ésteres MCPD em produtos de origem cereal.

❖ Métodos não-específicos baseados em transesterificação em meio alcalino

A transesterificação de metilato de sódio que é conduzida num curto período de tempo (até 10 minutos) foi introduzida pelo investigador Alemão Weisshaar (2008) e levou à redução significativa do tempo da preparação da amostra.

O método, combinado com salinização com cloreto de sódio, reacção com PBA e análise por GC/MS foi adoptado como método de *DGF C-III, 18 (09) A* (DGF 2009). Após a validação por ensaio colectivo (Fiebig 2011), o método foi modificado e adoptado como *DGF C-VI 17 (10)* (DGF 2011b).

❖ Métodos específicos baseados na transesterificação catalisada por meio alcalino mediante pré-tratamento com ácido

Com um intuito de ultrapassar a falta de especificidade mencionada acima, foi adicionado um passo de pré-tratamento por mistura de ácido sulfúrico/propanol, de modo a eliminar de forma selectiva, os ésteres de glicidol. Após pré-tratamento com ácido, o protocolo seguido foi o Método *DGF C-III, 18 (09) A* (DGF 2009). Este método foi introduzido como *DGF C-III 18 (09) B*, mas foi retirado no início do ano de 2011, já que foi provado que este seria insuficiente para uma determinação eficaz de ésteres de 3-MCPD (Fiebig 2011; Shimizu et al 2011).

❖ Métodos específicos com base na transesterificação alcalina sem salga.

Outra maneira de abordar a questão da especificidade é combinar transesterificação com base numa solução alcalina com salga. Aqui, é usado um sal diferente do cloreto de sódio, e esta abordagem tem sido muito aplicada, com várias modificações, por vários laboratórios. Foi posteriormente adoptado como Método *DGF C-VI 18 (10)* (*DGF 2011a*).

Estes métodos são específicos para 3-MCPD, mas a sua degradação durante o passo de transesterificação permanece um motivo de preocupação.

❖ Métodos específicos baseados na transesterificação leve por meio alcalino

Se a transesterificação alcalina for conduzida a temperaturas baixas, verifica-se uma eliminação indesejável da conversão de MCPD para glicidol (Kuhlmann 2011a), embora o tempo de transesterificação tenha sido prolongado para 18 horas (e, assim, torna-se comparável com a transesterificação catalisada por ácido).

Além da determinação de ambos os isómeros de MCPD, o método permite a determinação simultânea do teor total de ésteres de glicidol. Até agora, o método só foi realizado por um único laboratório, e o seu desempenho requer avaliação por tentativa colaborativa.

❖ Métodos para a determinação indirecta de ésteres glicídílicos

A escolha de um método para a determinação indirecta de ésteres de glicidol é ainda relativamente limitada. Uma opção, é uma abordagem diferencial que envolve a aplicação de duas análises independentes: um que determina a soma dos ésteres 3-MCPD e ésteres glicídílicos usando cloreto de sódio (*DGF 2011b*) e um específico que determina apenas ésteres de 3-MCPD. A partir da diferença de ambas as determinações, um montante total de ésteres glicídílicos pode ser calculado.

Foi desenvolvido por Kusters et al. (2011) um método para a determinação simultânea de ésteres glicídílicos e de ésteres de 3-MCPD em alimentos com base na conversão da porção de glicidol em 3-metoxipropano-1,2-diol (3-MPD) por metanólise, tendo sido validado este método para vários alimentos ricos em gordura.

## 2.2.16.2 Métodos Directos

A aplicação de métodos directos surgiu com base no facto de se ter tornado evidente que os dados obtidos pela análise química acabavam por não ser compatíveis por serem demasiado dependentes dos tipos de matrizes de classes específicas de alimentos.

Por este motivo, seria vantajoso desenvolver métodos de análise que não requeressem o intermédio de reacções químicas e que permitissem a medição directa dos ésteres.

Um grande número de substâncias que têm de ser incluídos nos ensaios, apresenta um grande desafio para a determinação directa de ésteres MCPD, já que é esperado que o padrão de distribuição dos ésteres de 3-MCPD e ésteres de glicídílicos siga o perfil dos ésteres de ácidos gordos do produto investigado.

A análise directa de 3-MCPD pode ser um processo lento e relativamente caro, principalmente devido às muitas espécies provenientes das diversas combinações de ácidos gordos associados a cada porção deste tipo de cloropropanol, e o custo elevado destes compostos de referência.

### 3. APLICAÇÃO DO CASO EM ESTUDO

A DanCake exporta cerca de 75% da sua produção e uma parte dessa percentagem dirige-se para um cliente Alemão. Para este cliente, são produzidos uma larga gama de produtos como bolos, tostas e também vários tipos de bolachas.

Este cliente tem padrões de especificação para o nível de 3-MCPD para vários tipos de produtos. Para os bolos, que são alvo de estudo nesta dissertação, o cliente exige que os valores de 3-MCPD não excedam 50% o valor actual de TDI estabelecido pela *EFSA* ou seja de 0,24 mg/kg de produto.

Pelas tabelas 4 e 5, pode-se observar a mudança que foi recentemente implementada pela *EFSA*, que se distinguiu pelo significativo decréscimo no valor de TDI e consequentemente, num novo valor imposto pelo cliente.

**Tabela 4-Critérios Legais Relativos aos níveis de 3-MCPD até Março de 2016**

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Unidade</i>
<b>TDI</b>	2	µg/ kg Body Weight
<b>Adulto</b>	60	kg Body Weight
<b>Quantidade Limite de 3-MCPD para Adulto</b>	120	µg/60 kg
<b>50% de 3-MCPD para Adulto</b>	60	(µg/60 kg/Daily Serving)
<b>Criança (&gt; 6 anos)</b>	30	kg body Weight
<b>Quantidade Limite de 3-MCPD para Criança (&gt;6 anos)</b>	60	µg/30 kg
<b>50% de 3-MCPD para Criança (&gt;6 anos)</b>	30	(µg/30 kg/Daily Serving)
<b>Criança (3 - 6 anos)</b>	15	kg Body Weight
<b>Quantidade Limite de 3-MCPD para Criança (3 - 6 anos)</b>	30	µg/15 kg
<b>50% de 3MCPD para Criança (3 - 6 anos)</b>	15	(µg/15 kg/Daily Serving)

**Tabela 5-Critérios Legais relativos aos níveis de 3-MCPD a partir de Março de 2016**

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Unidade</i>
<b>TDI</b>	0,8	µg/ kg body Weight
<b>Adulto</b>	60	kg body Weight
<b>Quantidade Limite de 3-MCPD para Adulto</b>	48	µg/60 kg
<b>50% de 3MCPD para Adulto</b>	24	(µg/60 kg/daily serving)
<b>Criança (&gt; 6 anos)</b>	30	kg body Weight
<b>Quantidade Limite de 3-MCPD para Criança (&gt;6 anos)</b>	24	µg/30 kg
<b>50% de 3-MCPD para Criança (&gt;6 anos)</b>	12	(µg/30 kg/daily serving)
<b>Criança (3 - 6 anos)</b>	15	kg body Weight
<b>Quantidade Limite de 3-MCPD para Criança (3 - 6 anos)</b>	12	µg/15 kg
<b>50% de 3-MCPD para Criança (3 - 6 anos)</b>	6	(µg/15 kg/daily serving)

O decréscimo nos níveis de TDI nos produtos segundo a legislação, refletem que a tendência é de uma crescente preocupação com o cumprimento dos níveis de 3-MCPD, o que implica o estudo e estabelecimento de medidas preventivas e correctivas quer a nível de processo, quer a nível de fornecedores e matérias-primas.

No seguimento desta dissertação, o foco de estudo vão ser várias amostras de bolos que são exportadas para o cliente alemão acima referido.

### 3.1 Objectivos do Estudo

O objectivo deste estudo é então encontrar factores que possam influenciar o crescimento dos níveis de 3-MCPD no produto final, bem como o desenvolvimento de um método de extracção e análise quantitativa do 3-MCPD em produtos alimentares. Neste sentido, vai ser elaborada uma análise a nível interno (fábrica e processo) e externo (matéria-prima e respectivos fornecedores).

Com base num estudo prévio das variáveis precursoras do aumento da concentração final de 3-MCPD em produtos de pastelaria, efectuou-se uma análise detalhada a cada receita das várias referências de bolos *Luxury*: Limão, Stracciatella, Cacau e Mármore. Posteriormente, após a detecção dos ingredientes críticos, procedeu-se à elaboração de várias receitas a nível piloto, cujo objectivo é fazer variar estes mesmos ingredientes, de modo a despistar qual deles é que tem uma maior contribuição no aumento da concentração final de 3-MCPD neste tipo de bolos. Ao todo, foram desenvolvidas cerca de 46 receitas para as 4 referências.

Foi também foco desta tese, o desenvolvimento em parceria com o Prof. Marco Silva e com o seu aluno Davide Mendes, de um método de análise quantitativa de concentrações de 3-MCPD por GC/MS. Através deste método, é possível averiguar através da realização de um número de amostras considerável, o que poderá estar na origem do aumento da quantidade de 3-MCPD.

Foram também efectuadas as mesmas análises às matérias-primas e variáveis de processo que se concluiu poderem ter de certa forma, alguma contribuição no aumento de 3-MCPD no produto final.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Processo de Extracção

#### 4.1.1 Reagentes:

- 3-chloro-1,2-propanediol;
- 3-chloro-1,2-propanediol-d<sub>5</sub> (99,4%);
- Diclorometano Chromasolv for HPLC > 99.8% Sigma Aldrich ;
- Sulfato de anidro;

#### 4.1.2 Materiais:

- Soxhelt;
- Balão volumétrico;
- Copo de precipitação;
- Balão de vidro;
- Banho de silicone;
- Manta de aquecimento;
- Coluna de refrigeração;
- Funil de vidro;
- Funil de porcelana;
- Kitasato;
- Proveta de 100 ml;
- Pipeta de plástico;
- Espátula;

### 4.2 Validação do Método de Extracção:

Para a quantificação de ésteres e da forma livre de 3-MCPD e baseado no artigo “*Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1,3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS*” by Sameer Abu-El-Haj, Maciej J. Bogusz<sup>\*</sup>, Zuhoor Ibrahim, Huda Hassan, Mohammed Al Tufail, testou-se a eficácia do método de extracção.

#### 4.2.1 Procedimento:

1. Pesar num vidro de relógio 2g da amostra sólida e de seguida colocar a amostra na cápsula de extracção.
2. Após colocação da cápsula no soxhelt, proceder à respectiva montagem do mesmo com a coluna de refrigeração.
3. Introduzir 100 ml de diclorometano no balão de vidro juntamente com uma pequena porção de reguladores de ebulição e unir o balão ao soxhelt.
4. Colocar o banho de sílica, a uma temperatura de cerca de 300°C e estabelecer um *SET POINT* de 130°C. No âmbito de estabelecer um bom rendimento a esta etapa, procedeu-se à elaboração de 3 montagens em série, para que três amostras sejam sujeitas ao processo de extracção em simultâneo, como demonstra na figura 21:



**Figura 21- Montagem do processo de extracção, com 3 montagens em simultâneo**

5. Estabelecer o número de lavagens pretendido, e após lavagem, remover o banho e deixar o balão arrefecer;
6. Após arrefecimento do balão, retirar o mesmo e colocá-lo numa sogra de cortiça. No âmbito de retirar os reguladores de ebulição, deve-se proceder a uma filtração simples, tendo o cuidado de após a mesma, lavar o filtro de modo a garantir que no filtro não restam vestígios de 3-MCPD.
7. Após o extracto estar isento de reguladores de ebulição, deve-se passar a solução para um copo de precipitação.
8. Proceder à adição de sulfato de anidro. Com a ajuda de uma espátula meter uma quantidade suficiente de modo a este sedimentar. Quando tal acontecer, deve-se agitar de modo a dissolver a máxima quantidade possível.
9. A solução preparada anteriormente deve ser filtrada a vácuo, de modo a garantir a recolha de todo o sulfato de anidro e passada para outro balão de vidro.
10. Proceder à secagem por evaporador rotativo. Deve-se ligar o banho a uma temperatura de cerca de 40°C (tendo em conta que o ponto de ebulição do diclorometano é 39,4°C).

A rotação deve ser cerca de 150 rpm e deve-se aguardar até a solução estar quase isenta de diclorometano, como se pode observar nas figuras 22 e 23.



**Figura 22- Processo de Secagem no evaporador rotativo**



**Figura 23- Amostra seca após processo de secagem**

11. Proceder à recolha da solução seca e colocação da mesma num frasco de vidro devidamente selado. As amostras devem ser armazenadas no frio.

Para a validação do método de extracção foram então realizados um total de 4 ensaios. Estes ensaios tiveram como objectivo validar o número de ciclos necessários para que uma quantidade suficiente do composto fosse extraída, utilizando o diclorometano como solvente.

Primeiramente, foi efectuada uma extracção com número de ciclos superior a 10, seguida de uma extracção com um número total de 10 ciclos. Para a validação de números ciclos mais curtos, procedeu-se posteriormente à extracção com 3 e 6 ciclos.

Pode-se verificar a diferença de cor entre ambas:



**Figura 24- Amostras de Óleo Extraído com diferentes números de lavagem**

Após este ensaio, foi conclusivo que seriam necessárias um total de 10 ciclos para que o 3-MCPD fosse extraído com sucesso, e assim procedeu-se ao processo de extracção de um total de 51 amostras sólidas e de 8 amostras líquidas, das quais estão incluídas amostras de bolos e respectivas matérias-primas, e água de lavagem das formas.

#### 4.2.1.1 Amostras sólidas:

- Foi utilizada a mesma metodologia e materiais usados no ponto 4.1;

#### 4.2.1.2 Amostras líquidas:

- Reagentes:

- Diclorometano;

- Materiais:

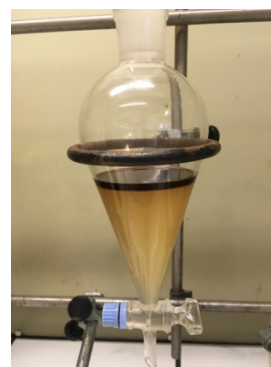
- 1 ampola de decantação de 250 ml;
- Balão de vidro de 250 ml;
- Balão Volumétrico de 100 ml;
- Evaporador Rotativo;

- Procedimento:

- Pesar 20 ml da amostra líquida no balão volumétrico;
- Encher o balão volumétrico de diclorometano até satisfazer os 100 ml;
- Agitar vigorosamente de modo a ser visível duas fases como representado nas figuras seguintes:



**Figura 25 - Representação da Extração Líquido-Líquido do Aroma de Baunilha Natural com Diclorometano**



**Figura 26- Representação da Extração Líquido-Líquido do Extracto de Cacau com Diclorometano**

- Transferir o conteúdo do balão volumétrico com a ajuda de um funil de vidro para a ampola de decantação e esperar que a separação das duas fases esteja completa;
- Transferir o diclorometano para um copo de precipitação e de seguida, com a ajuda de um funil de vidro proceder à sua transferência para um balão de vidro;
- Proceder à secagem da amostra no evaporador rotativo;
- Após secagem, com a ajuda de uma pipeta de plástico, proceder à recolha da amostra resultante e colocação da mesma num frasco de vidro bem selado e tapado e armazenar no frio.

## 4.3 Análise de GC/MS

### 4.3.1 Reagentes:

- 3-chloro-1,2-propanediol Aldrich;
- 3-chloro-1,2-propanediol- $\text{d}_5$  (99,4%) Sigma Aldrich;
- Heptafluorobutyric anhydride (HFBA);
- N,O bis (trimetilsilil)trifluoro-acetamida (BSTFA) com Trimetilclorosilano (TMS) ( 1% TMS; 99% (excluindo TMCS)) Sigma Aldrich;
- Aldrich Diclorometano Chromasolv for HPLC > 99.8% Sigma- Aldrich;
- Solução Grob Sigma-Aldrich;

### 4.3.2 Materiais:

1. Vials de 300  $\mu\text{l}$  Chromacol;
2. Balão Volumétrico de 5 ml;
3. Balão Volumétrico de 10 ml;
4. Balão Volumétrico de 100 ml;
5. Copo de precipitação;
6. Micropipeta de 100  $\mu\text{l}$  200  $\mu\text{l}$ ;
7. Micropipeta capilar de vidro;
8. Pompete;
9. Pipeta Volumétrica de 5 ml;
10. Pipeta Volumétrica de 2 ml;
11. Pipeta Volumétrica de 1 ml;
12. Balança Analítica;
13. Aparelho de GC- BRUKER SCION TQ 456-GC.

### 4.3.3 GC/MS: Uma Breve Introdução

Espectrometria de Massa por Cromatografia Gasosa (GC/MS) consiste numa técnica quantitativa e qualitativa direcionada a compostos com baixos limites de detecção (LOD). As análises GC/MS são direcionadas para analitos líquidos, gasosos e sólidos, mas estão principalmente restritas à identificação de compostos considerados voláteis e semi-voláteis [55] .

Na Cromatografia de Gasosa (GC), uma amostra analítica é volatilizada e transportada por um gás inerte, que no caso em estudo é o Hélio, através de uma coluna de sílica, estando a fase estacionária ligada ao interior da coluna [55].

Cada analito interage com a fase estacionária em modos diferentes. Os que interagem muito pouco se movem através da coluna rapidamente e saem para o espectrómetro de massa antes dos analitos terem mais tempo de interação e retenção. Quando os analitos saem de forma individual da coluna GC, entram na área de ionização da MS. Estes fragmentos sofrem então uma ionização que se traduz numa aceleração para o quadrupolo através de uma série de lentes. Após este passo procede-se a uma separação com base

na sua relação massa / carga. Esta separação é obtida através da aplicação de frequência de RF alternada e de uma tensão de CC a extremidades diagonalmente opostas do quadrupolo, o que por sua vez permite que um fragmento de massa específico passe através do filtro quadrapolar. A partir daqui dá-se a entrada e o registo dos fragmentos no detector de massa, onde existe uma gravação do percurso efectuado ao espectro de massa. Este percurso dita a abundância de cada fragmento de massa ionizada [55].

Podem ser por isso utilizados vários modos de operação do aparelho:

1. **Full Scan:** Permite a observação de um número ilimitado de analitos;
2. **SIM (Single Ion Monitoring):** Apenas permite a observação de alguns iões;
3. **MRM (Multiple Reaction Monitoring):** Permite a elaboração de uma análise de fragmentação. Neste tipo de modo, é feito um ajuste da energia de fragmentação necessária, ou seja, da energia de ionização.

O tempo que leva um determinado composto a passar através da coluna para um detector é denominado de "tempo de retenção". Esta variável pode ser usada para identificação quando comparado com uma referência.

Na fase de espectrometria de massa (MS) de GC/MS, os compostos que deixam a coluna GC são fragmentados por impacto de eletrolítico. Os fragmentos carregados são detectados, e o espectro subsequente obtido pode ser utilizado para identificar a molécula. Os padrões de fragmentação são reproduzíveis e podem ser utilizados para produzir medições quantitativas [55].

#### 4.3.4 Condições Cromatográficas

##### 4.3.4.1 Condições de GC/ MS-SIM:

As análises foram realizadas num sistema GC / MS constituído por um Bruker GC 456 com um detector selectivo de massa *Bruker Scion TQ*. Utilizou-se um injector de amostras automático: *CTC Analysis autoamplifier CombiPAL*.

Os dados foram adquiridos com MSWS 8.2 Bruker e analisados com *Bruker MS Data Review 8.0*. A separação cromatográfica foi obtida numa coluna capilar ZB-WAX PLUS (30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm df) ligada a uma coluna capilar ZB-5 MS (30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm filme df), ambos fornecidos por *Phenomenex, Torrance, CA, EUA*.

A fim de realizar o controlo de fluxo, utilizou-se uma terceira coluna capilar desactivada (30 m x 0,25 mm i.d.) fornecida por *Bruker, Billerica, MA, EUA*. Todas as três colunas foram conectadas por meio de um *Valco VICI - T* de aço inoxidável 1/32 "(*Tubing OD*), 0,25 (*Bore*) *Dean interruptor, VICI, AG, International, Schenkon*, durante 5 min, elevadas a 4 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C e mantidas durante 5 min.

O hélio foi utilizado a pressão constante de gás transportador de 35,0 psi no controlo de fluxo electrónico (*EFC 21*) e 23,0 psi no *EFC 24*.

A temperatura de transferência e a temperatura da fonte de MS foram ajustadas, respectivamente, entre 240 °C e 220 °C.

#### 4.3.5 Estudo de Validação do Método de GC/MS

Como referido no ponto 4.3, a análise de GC/MS é indicada principalmente para a análise de compostos voláteis, semi-voláteis e termolábeis. Como o 3-MCPD não apresenta nenhuma das características referidas anteriormente, foi difícil inicialmente estabelecer os parâmetros necessários para que este pudesse ser quantificado com sucesso.

Foi necessário o uso de uma solução padrão de 3-MCPD e de outra deuterada para que primeiramente, se pudesse ajustar as variáveis necessárias para a posterior quantificação do mesmo.

Antes de se proceder à análise das soluções padrão de 3-MCPD e do seu deuterado, recorreu-se à verificação da qualidade da coluna de GC. O cromatograma da solução Grob encontra-se disponível no anexo B, na figura B1.

**Solução Padrão de 3-MCPD:** Foi usada uma solução padrão de 3-MCPD para se poder obter o tempo de retenção (RT) e o respectivo espectro de massa (MS), como se pode observar na figura B3 no anexo B. Soube-se também através da análise da mesma, que o composto deixa a coluna de GC antes de atingir uma temperatura de 150°C.

O uso deste tipo de padrão permite também a obtenção de parâmetros como o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ), através da elaboração de uma curva de calibração.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_y}{b}$$

**Equação 6-Limite de Detecção**

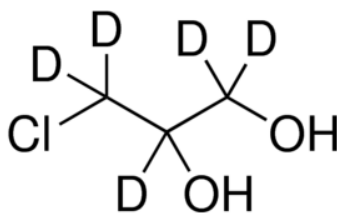
$$LOQ = \frac{10 \times S_y}{b}$$

**Equação 7-Limite de Quantificação**

onde:

- $S_y$  = Desvio padrão Residual da Curva de Calibração;
- $b$  = Declive da Recta de Calibração

**Solução deuterada de 3-MCPD (3-MCPD-d<sub>5</sub>):** Para a quantificação das amostras em causa, é necessária a presença de um elemento que não seja naturalmente presente na natureza, já que a fragmentação da molécula de 3-MCPD pode variar entre injeções e quantidades. Desta forma a adição do padrão deuterado de 3-MCPD possibilita a anulação de variabilidade que possa ocorrer. A presença deste tipo de padrão permite elaborar um *ratio*, para posteriormente se obter uma quantificação de 3-MCPD nas amostras analisadas.



**Figura 27- Estrutura do 3-MCPD d<sub>5</sub>**

#### 4.3.6 Derivatização

Primeiramente, e no âmbito de atribuir ao método uma acção de melhoria direccionada para a diminuição dos seus custos associados e do tempo que este demora a ser efectuado, decidiu-se testar se o 3-MCPD era perfeitamente quantificável em GC/MS sem a aplicação do processo de derivatização.

##### 4.3.6.1 Em que consiste a Derivatização?

A derivatização é um processo onde um determinado composto sofre uma alteração a nível químico que resulta na produção de um novo composto com propriedades mais favoráveis para um determinado método analítico. O composto é quimicamente alterado, produzindo um novo composto que tem propriedades mais favoráveis para ser posteriormente analisado.

Os compostos que têm pouca volatilidade, fraca estabilidade térmica ou que registam actividade no injector exibirão áreas, alturas e formas de pico não reprodutíveis. Outros compostos que respondem mal num detector específico podem precisar ser "marcados" com um grupo funcional diferente para melhorar a sua detecção, e para tal ocorrer, o uso de um agente derivatizante é essencial [56] .

#### 4.3.7 Tentativa de implementação da ausência de Derivatização

No caso em estudo, tendo em conta o custo associado aos agentes derivatizantes e aos passos que o processo de derivatização em si implicam, tornando o passo de quantificação de 3-MCPD um processo mais lento, testou-se então a hipótese de quantificação de 3-MCPD sem a adição desta etapa.

Nessa medida, efectuou-se a tentativa de observar em GC/MS várias concentrações de 3-MCPD padrão e do seu deuterado em diclorometano, como se pode observar na tabela 6.



**Tabela 6 - Diluições efectuadas de 3-MCPD padrão e Deuterado**

Diluições Feitas	
<i>3-MCPD Padrão</i>	<i>3-MCPD-d5</i>
1000 ppm*	1336 ppm*
100 ppm	136 ppm
10 ppm	100 ppm
1 ppm	13,36 ppm
300 ppb	136 ppb
250 ppb	50 ppb
200 ppb	13,36 ppb
150 ppb	10 ppb
100 ppb	-
50 ppb	-
10 ppb	-
1 ppb	-

\*- A solução de 3-MCPD Padrão de 1000 ppm correspondeu à solução mãe, onde para a elaboração da mesma se efectuou os seguintes passos:

1. Recorrendo ao recipiente da solução Padrão de 3-MCPD (3-chloro-1,2-propanediol) de 100 mg, encheu-se o mesmo recipiente de 5 ml de diclorometano com ajuda de uma pipeta volumétrica de 5 ml. De seguida, fechar a tampa e agitar vigorosamente de modo a garantir que o diclorometano cobre toda a superfície do frasco (incluindo a tampa);
2. Repetir este passo até satisfazer o volume de um balão volumétrico de 100 ml;

\*- A solução deuterada de 3-MCPD de 1336 ppm correspondeu à solução mãe, onde para a elaboração da mesma se efectuou os seguintes passos:

1. Recorrendo ao recipiente da solução deuterada de 3-MCPD (3-chloro-1,2-propanediol- d<sub>5</sub>) de 25 mg e tendo em conta que se está a lidar com quantidades muito pequenas de produto, recorreu-se à pesagem do mesmo com uma micropipeta. O alvo seria conseguir pesar 10 mg do mesmo com a ajuda de uma balança analítica e num balão volumétrico de 5 ml;
2. No entanto, devido à viscosidade do produto e para evitar grandes perdas do mesmo, pesou-se uma quantidade exacta de 6,680 mg. Após esta pesagem, recorreu-se ao preenchimento do volume restante do balão volumétrico com diclorometano.

Foram também efectuadas medições nos diversos modos de operação do aparelho de GC/MS: Full-Scan, SIM e MRM. O estudo centrou-se numa gama de 5 a 40 eV, recorrendo a uma variação de escala de 5 eV, tendo-se concluído que a energia de ionização necessária para fragmentar o composto neste caso seria de 10 eV, como se pode verificar na figura B 11 em anexo.

No entanto, concluiu-se que mesmo para uma gama considerável de 10 ppm o composto não era suficientemente visível para ser quantificado, já que o pico apresentava uma baixa área de pico o que demonstra que existe muita pouca sensibilidade do método analítico com a ausência de qualquer agente derivatizante, como se pode verificar na figura B5 que demonstra a variação das várias concentrações de 3-MCPD padrão. Na figura B6 e B7 é também possível verificar o cromatograma definido (TIC) de várias das concentrações de 3-MCPD, da mais concentrada para a mais diluída.

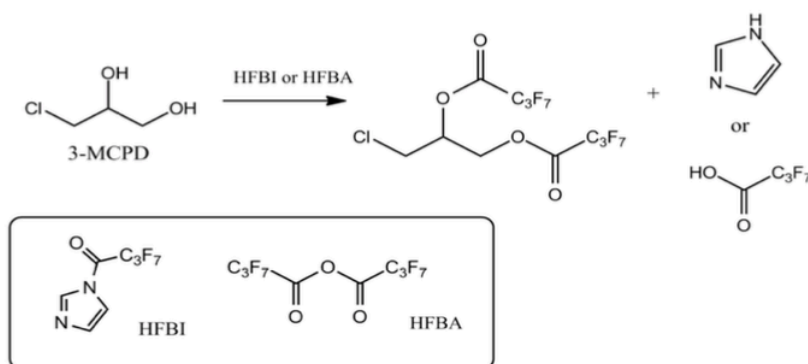
#### 4.3.8 Derivatização com agente HFB

Tendo em conta factores mencionados no ponto 5.3.6, concluiu-se que a ausência de derivatização no processo de quantificação de 3-MCPD por GC/MS não conduz a uma análise suficientemente sensível e exacta. Existe inclusive referência que as características físicas dos cloropropanois em geral complicam o processo de análise por cromatografia gasosa. A baixa volatilidade e alta polaridade características deste tipo de compostos favorecem indesejáveis interações entre compostos do sistema do GC que resultam posteriormente em resultados que refletem uma forma muito pobre em termos de pico, o que confere ao método uma sensibilidade muito baixa [50].

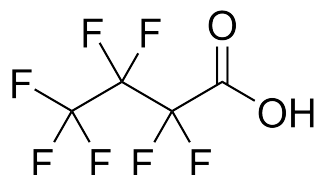
Como se pode observar no ponto 2.2.16, dentro dos agentes derivatizantes HFB, existe a possibilidade de uso de HFBA ou HFBI.

Na figura 28, pode ser observada a reacção de derivatização de 3-MCPD que ocorre com cada um dos agentes derivatizantes e respectiva molécula resultante. Devido ao facto de o HFBA ser uma alternativa mais barata ao HFBI (cerca de 2 vezes menos), a primeira opção escolhida para este caso de estudo.

Na figura 29, pode ser observada a caracterização estrutural do HFBA.



**Figura 28- Reacção de Derivatização de 3-MCPD com HFBI e HFBA [20]**



**Figura 29- Caracterização Estrutural do HFBA**

Para determinar a eficácia deste agente derivatizante, procedeu-se á elaboração dos seguintes passos:

1. Colocação em 5 vials cerca de 300 µl das seguintes soluções de 3-MCPD padrão em diclorometano: 10 ppm, 100 ppm, 100 ppb, 10 ppb e 1 ppb.
2. Levou-se posteriormente os seguintes vials à secura com azoto durante cerca de 30 minutos;

3. Com a ajuda de uma micropipeta, transferiu-se o conteúdo de 1 embalagem de HFBA de 1 ml para um frasco de vidro, de modo a facilitar a transferência deste conteúdo para os vials;
4. Já com as amostras isentas de qualquer tipo de solvente, foram transferidos 200 µl de HFBA e 100 µl de diclorometano, satisfazendo um volume total de solução de 300 µl.
5. Procedeu-se à análise de GC/MS de cada uma delas;

Após a análise da primeira amostra, ou seja, da concentração de 10 ppm esperava-se obter um pico com uma área e forma significativas. Porém, tal não aconteceu, tendo-se obtido um pico bastante pequeno e com uma forma indesejável para uma solução derivatizada, como se pode verificar na figura B22 à B30 em anexo. É também possível verificar a fraca sensibilidade das restantes concentrações analisadas nos restantes cromatogramas TIC em anexo.

Embora o HFBI / HFBA sejam os agentes de derivatização usados mais frequentemente para a determinação de cloropropanóis, existem já algum conhecimento da sua eficácia enquanto agentes derivatizantes. Retho e Blanchard (2005) e Cao et al. (2009) fizeram uma avaliação relativamente às limitações do processo de derivatização com estes dois tipos de agentes derivatizantes. Em primeiro lugar, estes podem reagir com todos os compostos nucleofílicos presentes na amostra extraída, o que implica a obtenção de resultados com um índice sinal-ruído elevado e a obtenção de uma baixa sensibilidade.

Em segundo lugar, as abundâncias dos iões característicos são baixas e, além disso, este tipo de derivatizantes são muito sensíveis à humidade, criando dificuldades para realizar posteriormente o processo de derivatização.

Ao contrário do HFBI, o HFBA em particular tem tendência a produzir sub-produtos ácidos no final do processo de derivatização e isso inevitavelmente reduz a vida da coluna de um sistema de cromatografia em fase gasosa [20].

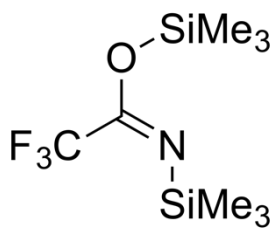
#### 4.3.9 Derivatização com BSTFA

Perante os maus resultados obtidos com a derivatização com o HFBA, decidiu-se então substituir este agente derivatizante por outro, que pudesse proporcionar ao método analítico uma melhor sensibilidade, tendo-se optado posteriormente pelo N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

O restante procedimento usando este agente derivatizante, foi com base no artigo *Combined Solid-Phase extraction and gas Chromatography- mass spectrometry used for the determination of chloropropanols* [52].

As primeiras experiências de derivatização de 3-MCPD com BSTFA foram feitas por Kissa (1992), tendo depois sido o processo de cromatografia elaborado por GC-FID. Posteriormente Bodén and others (1997) recorreram ao mesmo processo de derivatização, porém recorreram ao GC/MS-SIM.

Considerado um agente de siliação, o BSTFA substitui o grupo hidroxilo com o grupo trimetilsililo (TMS). Amostras analíticas derivatizadas com este composto tendem a ter portanto, uma maior resistência ao calor, o que confere depois às mesmas uma maior estabilidade ao produto final analisado [51].

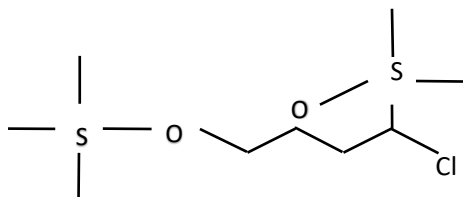


**Figura 30- Caracterização Estrutural do BSTFA**

Para determinar a eficácia deste agente derivatizante, procedeu-se à elaboração dos seguintes passos:

1. Colocação num vial cerca de 300 µl da solução de 3-MCPD padrão em diclorometano de 10 ppm.
2. Levou-se posteriormente o vial à secura com azoto durante cerca de 30 minutos;
3. Com a ajuda de uma micropipeta, transferiu-se 100 µl da solução N,O bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com Trimetilclorosilano (TMS) ( 1% TMS; 99% (excluindo TMCS)) para o vial já isento de qualquer tipo de solvente, juntamente com 200 µl de diclorometano, satisfazendo um volume total de 300 µl.
4. Procedeu-se à análise de GC/MS dessa amostra, de modo a obter resultados conclusivos relativamente à eficácia deste tipo de agente derivatizante.

Logo após análise de resultados no GC/MS, concluiu-se que tanto a área como a forma do pico são mais características de uma reacção de derivatização, tendo sido obtida a seguinte molécula resultante deste tipo de mecanismo:



**Figura 31- Molécula Obtida após derivatização de 3-MCPD com BSTFA**

O cromatograma correspondente à derivatização por BSTFA da solução padrão, pode ser observado na figura B31 em modo SIM em anexo, tendo o composto apresentado um tempo de retenção de 14,18 s.

Por isso, no âmbito de verificar se a derivatização com este agente é totalmente eficaz e no âmbito de se estabelecer uma curva de calibração, elaboraram-se várias concentrações de 3-MCPD em diclorometano das quais constam: 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 25 ppb, 50 ppb, 75 ppb, 100 ppb, 125 ppb, 150 ppb, 200 ppb, 250 ppb e 300 ppb.

Estas diluições foram sujeitas ao processo de secura e de derivatização da mesma forma descrita anteriormente, sendo posteriormente analisadas em GC.

Após a análise das concentrações anteriormente referidas, concluiu-se que o composto é derivatizado por BSFTA nas condições descritas, como se pode comprovar nas figuras B32 até à B69 anexadas. Este tipo de análise tinha a finalidade de esclarecer até que concentrações o aparelho consegue detectar o composto, de modo a estabelecer-se uma curva de calibração. No entanto, verificou-se alguma evaporação por parte do conteúdo presente nos vials, pelo que se decidiu proceder à elaboração de novas amostras para se estabelecer então a curva de calibração.

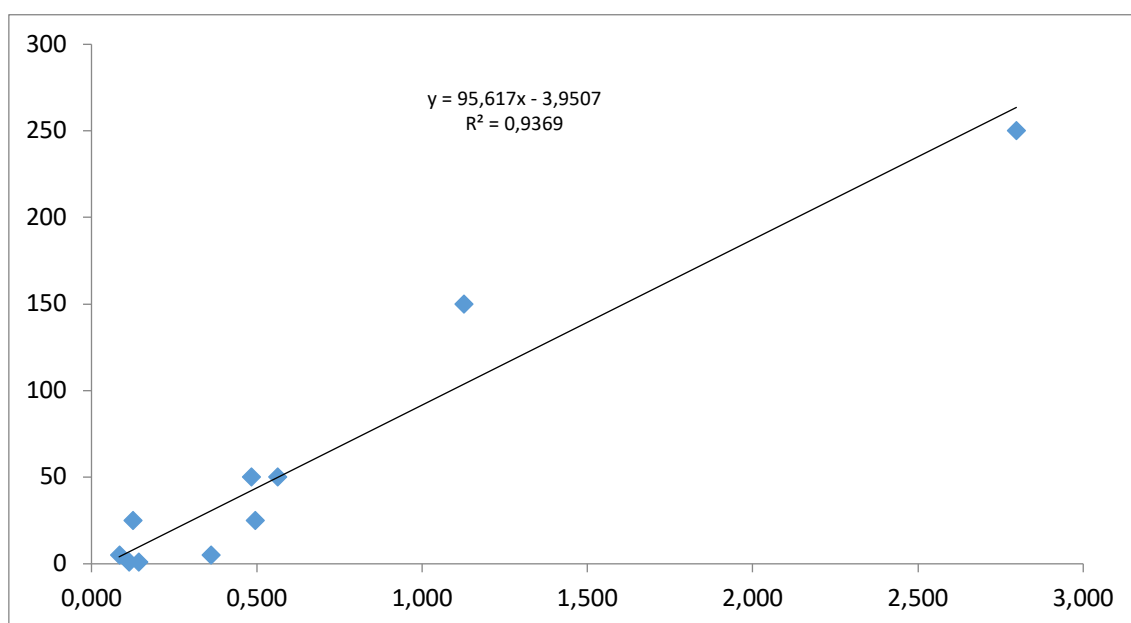
Posteriormente, procedeu-se à elaboração de mais amostras que foram sujeitas ao mesmo processo que as anteriores, com as seguintes concentrações da solução padrão em diclorometano: 1 ppb, 5 ppb, 25 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 150 ppb, 200 ppb e 250 ppb.

Após o processo de secura, procedeu-se à adição da mesma quantidade de agente derivatizante (100 µl), juntamente com 100 µl de 3-MCPD-d<sub>5</sub> a 136 ppb, obtendo assim uma concentração conhecida de deuterado dentro do vial de 68 ppb.

Após este passo, recorre-se então à derivatização durante os 70 minutos a 60°C, procedeu-se depois à análise em GC em modo Full-Scan e SIM para a obtenção da curva de calibração.

Para efeitos analíticos e para a elaboração da curva de calibração, foram elaborados dois ensaios com as concentrações acima definidas, tendo-se estimado um limite de detecção (LOD) de 1 ppb.

**Figura 32-Curva de Calibração Obtida**



#### 4.3.10 Preparação das Soluções das Amostras Extraídas

Após obtenção da curva de calibração, procedeu-se à preparação das amostras resultantes do processo de extracção acima mencionado, através da elaboração dos seguintes passos:

1. Primeiramente, as amostras extraídas foram sujeitas a um processo de secura do diclorometano restante;
2. Após secura, foi adicionada uma quantidade conhecida de diclorometano em cada amostra (2 ml);
3. Seguidamente, procedeu-se à transferência de 300 µl do conteúdo de cada frasco de amostra extraída, de modo a satisfazer todo o volume do vial;
4. Para garantir a ausência de qualquer vestígio de água, de modo a não reagir com o BSTFA, as amostras foram sujeitas a um processo de secura por corrente de azoto durante cerca de 30 min;

5. Nas condições acima referidas, os vials já estão prontos para a solução derivatizada ser adicionada. Assim, foram adicionados 200 µl de solução padrão deuterada de 136 ppb com 100 µl da solução derivatizante de BSTA, de modo a satisfazer o volume total do vial;
6. Após esta etapa, os vials foram submetidos a uma temperatura de 60°C durante 70 min para que a reacção de derivatização ocorresse.
7. Procedeu-se à análise de GC de cada amostra.

## 5. ANÁLISE DE RESULTADOS

### 5.1 Receitas Desenvolvidas

No âmbito de apurar uma causa directa para a formação de 3-MCPD, durante a formação do produto em si, procedeu-se à elaboração de várias receitas que foram posteriormente elaboradas em fábrica piloto.

Para cada referência foram elaboradas várias receitas onde em cada uma, é alterada uma variável que após pesquisa, comprovou ser um possível factor precursor à formação de 3-MCPD.

No entanto, é importante referir que as condições a nível piloto não são, nem podem ser as mesmas que a nível industrial. A nível piloto o forno é eléctrico e não atinge temperaturas tão altas como à escala industrial e a temperatura ambiente também não é equiparável, assim como as restantes condições de operação.

Assim, com base na receita já existente para cada uma das referências, foram desenvolvidas um total de 46 receitas à escala piloto, onde foi estudada a influência de 9 variáveis:

1. Óleo de palma;
2. Presença de Cloro;
3. Colco Mono;
4. Aromas;
5. Limão em Pó;
6. Glicerina;
7. Óleo Desmoldante;
8. Tipo de Farinha;
9. Sal;

Na tabela 6, estão representadas de forma esquemática todas as receitas desenvolvidas para as 4 referências existentes: Limão, Stracciatella, Cacau e Mármore:

**Tabela 6-Receitas Desenvolvidas na Fábrica Piloto**

Receitas Desenvolvidas	Referências			
	Limão	Stracciatella	Cacau	Mármore
	Metade óleo palma	Metade óleo palma	Metade óleo palma	Metade óleo palma
	Com Cloro (2g)	Com Cloro (2g)	Com Cloro (2g)	Com Cloro (2g)
	Sem óleo palma	Sem óleo palma	Sem óleo palma	Sem óleo palma
	Sem Colco Mono	Sem Colco Mono	Sem Colco Mono	Sem Colco Mono
	Sem aroma	Com água Destilada	Com água Destilada	Com água Destilada
	Com água Destilada	Mínimo Óleo Desmoldante	Mínimo Óleo Desmoldante	Mínimo Óleo Desmoldante
	Triplo Limão em Pó	Triplo Óleo Desmoldante	Triplo Óleo Desmoldante	Triplo Óleo Desmoldante
	Mínimo Óleo Desmoldante	Sem Glicerina	Sem Glicerina	Sem Glicerina
	Triplo Óleo Desmoldante	Farinha Granel	Farinha Granel	Farinha Granel
	Sem Glicerina	Standart	Standart	Standart
	Farinha Granel	Dobro do Sal	Dobro do Sal	Dobro do Sal
	Standart	-	-	-
	Dobro do Sal	-	-	-

- **Influência do óleo de Palma:** Este factor foi avaliado através do desenvolvimento de 3 receitas distintas, dadas como padrões denominados “preto”, “cinzento” e “branco”:
  1. **Preto:** Receita standart, que inclui a quantidade em vigor de óleo de palma adicionada na receita;
  2. **Cinzento:** Receita com metade de óleo de palma. Nesta receita, a quantidade adicionada de óleo de palma na receita standart, é reduzida para metade. Porém, como a quantidade de gordura total do bolo tem que ser sempre a mesma, a quantidade de óleo de palma retirada, foi acrescentada em óleo de girassol.
  3. **Branco:** Receita sem óleo de palma. Nesta receita todo o óleo de palma é retirado e a mesma quantidade é substituída unicamente por óleo de girassol;
- **Influência do Cloro:** Nesta variável estabeleceu-se dois padrões: um “preto” e outro “branco”:
  1. **Preto:** No âmbito de determinar a influência da presença de cloro no produto na formação de 3-MCPD, foi recolhida uma amostra do cloro introduzido no depósito de tratamento da água, e foi inserida na receita uma quantidade conhecida de 2g desta mesma solução.
  2. **Branco:** Para a avaliação da contribuição da ausência de cloro na receita, em vez de se adicionada água da rede, procedeu-se à adição da mesma quantidade de água destilada, no âmbito de se obter uma massa completamente isenta de cloro.
- **Influência dos Emulsionantes:** Tendo em conta que o colco mono é um ingrediente que actua como um emulsionante na receita de ambas as referências, foi desenvolvida uma receita onde este ingrediente não é adicionado, no âmbito de testar a sua influência na formação de 3-MCPD.
- **Influência dos Aromas:** Testou-se a influência deste tipo de ingredientes nas seguintes referências:
  1. **Referência Limão:** Este factor foi mais considerado na referência de limão, já que nesta referência é acrescentada à receita uma quantidade conhecida de aroma de limão e de sumo de limão em pó.  
 Inicialmente, pensou-se que a adição destes dois ingredientes iria acidificar a massa e por consequência, conduzir a um pH óptimo para a formação de 3-MCPD. Por isso, procedeu-se ao desenvolvimento de uma receita cujos ambos ingredientes em forma individual, estão ausentes, de modo a poder despistar a sua contribuição na formação de 3-MCPD.  
 O sumo de limão em pó consiste numa massa de sumo de limão liofilizado que confere uma maior acidez ao produto final. Para estudar a influência deste ingrediente, procedeu-se à introdução do triplo da quantidade que é normalmente usada na receita na ausência do aroma de limão. Assim, é possível o estudo mais rigoroso apenas da contribuição da presença do sumo de limão em pó.



No entanto, para se descartar qualquer possibilidade irá ser realizada uma análise a uma amostra de aroma e de limão em pó, no âmbito de se verificar alguma presença de 3-MCPD.

2. **Mármore e Cacau:** Na receita de cacau e de mármore (neste último caso apenas no óleo mármore) é adicionada uma pequena quantidade de um aroma denominado extracto de cacau.

Assim, para obter resultados mais conclusivos relativamente a este tipo de aroma, vai-se proceder à análise do teor de 3-MCPD do mesmo.

3. **Stracciatella:** Neste tipo de referência em semelhança à massa branca do bolo mármore, é adicionada uma pequena quantidade de aroma de baunilha. Para poder descartar qualquer hipótese deste tipo de aroma estar a causar a formação de 3-MCPD efectuou-se a análise desta matéria-prima.

- **Influência do Óleo Desmoldante:** Neste tipo de matéria-prima, existe um grau de variabilidade bastante elevado em produção industrial. A nível piloto, o objectivo é testar a formação de 3-MCPD com diferentes quantidades de óleo desmoldante, tendo-se estabelecido 3 tipos de padrão:

1. **Branco:** Receita strandart, cujo valor nominal estabelecido para a quantidade de óleo desmoldante por forma é de 24g;
2. **Cinzento:** Desenvolvimento de uma receita cujas formas são untadas com um valor mínimo estabelecido de 22g de óleo desmoldante;
3. **Preto:** Desenvolvimento de uma receita cujas formas são untadas com o triplo da quantidade nominal estabelecida, ou seja, 72g;

Para o estudo mais aprofundado da influência desta matéria-prima na quantificação de 3-MCPD no produto final, procedeu-se à análise directa da mesma.

- **Influência da Glicerina:** Como foi referido no capítulo *Agentes Percursores*, o glicerol é um dos agentes percursores mais contributivo para a formação de ésteres de 3-MCPD. Por isso, tendo em conta esta contribuição tão significativa decidiu-se o desenvolvimento de uma receita livre de glicerina.
- **Influência do Sal:** Em semelhança à glicerina, o cloreto de sódio (denominado correntemente por sal) é também um forte agente precursor á formação de ésteres de 3-MCPD.  
Assim, para a avaliação da contribuição deste factor, foi desenvolvida uma receita com o dobro da quantidade estabelecida na receita standart.
- **Influência do tipo de Farinha:** Para descartar a hipótese de que o tipo de farinha poderá estar na origem da formação de ésteres de 3-MCPD, foi realizada uma receita onde a farinha T55 com força E1 do fornecedor *Cerealis* é substituída por a farinha T65 W140 do fornecedor

*Granel.* É de notar que a aparência e textura do produto final aparentou não apresentar qualquer alteração.

É de notar que os bolos realizados em escala piloto foram feitos sem cobertura, devido à impossibilidade de os cobrir. A opção de os cobrir na própria linha era impossível, pois o planeamento para a produção deste tipo de produto para este cliente em específico, estava programado para datas pouco favoráveis. Logo, a análise à cobertura foi feita à matéria-prima em si, ou seja, às cápsulas de chocolate que são posteriormente derretidas.

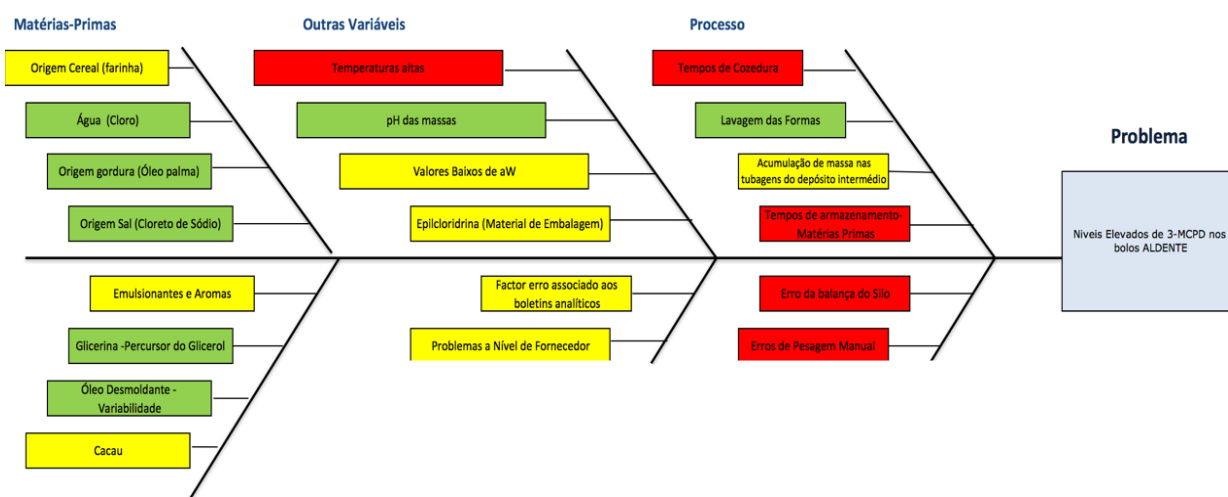
## 5.2 Análise Causa-Efeito

No âmbito da identificação de possíveis causas para o problema da presença de níveis elevados de 3-MCPD nos bolos, foi efectuado um digrama de Ishikawa ou espinha de peixe, que tem como objectivo o aumento da eficiência tanto na detecção de problemas, como na gestão e actuação dos mesmos.

Facilitando a gestão e o controlo de qualidade, este tipo de ferramenta permite através da sua estrutura causa e efeito, identificar o problema e as causas possíveis para o mesmo, através de uma classificação hierarquizada.

Com base em pesquisas bibliográficas e na análise das receitas originais e respectivo processo de fabrico, foram apuradas um total 20 variáveis que podem estar associadas a níveis elevados de 3-MCPD nestas amostras de bolos, estando categorizadas em diversas origens: Matérias-Primas, Processo e Outras Variáveis.

Foi feita posteriormente uma análise detalhada de cada sub-causa como se pode observar na figura 33, tendo sido atribuída a cada uma delas uma etiqueta de cor, conforme a capacidade de resolução da mesma com a seguinte legenda:



**Figura 33- Diagrama de Ishikawa relativo aos níveis elevados de 3-MCPD das amostras em estudo.**

- Não é possível solucionar ou de difícil resolução;
- Talvez seja possível solucionar, porém pode não ser um factor muito contributivo;

- Resolução possível, agregada a uma causa com grande impacto no problema;

Assim, algumas variáveis poderão ser à partida descartadas (variáveis a vermelho), pelo que se deu foco principalmente às variáveis que estão a amarelo e a verde.

De seguida, apresenta-se uma breve descrição da análise de decisão elaborada a cada uma das sub-causas:

### 5.2.1 Matérias-Primas:

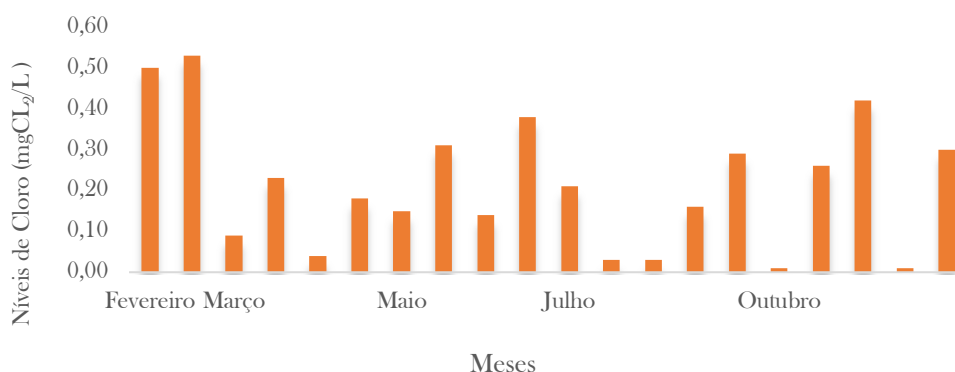
- o **Origem Cereal (Farinha):** Como descrito na bibliografia, produtos de origem cereal que são sujeitos posteriormente a altas temperaturas, podem induzir à formação do 3-MCPD. A este ponto não foi dada extrema prioridade, já que a farinha é um ingrediente imprescindível para a formulação deste tipo de produto, fazendo parte de cerca de 25% do total da receita. Há que referir que para este cliente é exigida um tipo específico de farinha – Farinha T55 força E1 de um fornecedor específico de farinhas. O parâmetro correspondente à força da farinha intervém na consistência e volume do produto final, pelo que será difícil a mudança da mesma. No entanto, serão analisadas amostras de bolos com diferentes tipos de fornecedores de farinha, de modo a poder concluir, se o problema poderá ou não ter origem no fabricante.
- o **Água (Cloro):** O ião cloreto é considerado um dos principais precursores para a formação de 3-MCPD e por isso, decidiu-se estabelecer uma prioridade alta para esta sub-causa. A melhor maneira de testar a importância da mesma seria avaliar os níveis de cloro da água e tentar estabelecer uma curva de variabilidade da concentração do mesmo. Por isso, procedeu-se à análise das recolhas efectuadas pelo laboratório interno até Outubro de 2016, obtendo-se os resultados visíveis na tabela 7 e na figura 33.

**Tabela 5-7-Resultados analíticos dos níveis de cloro realizados pelo laboratório interno durante os períodos de tempo determinados**

Níveis de Cloro (mg CL <sub>2</sub> /L)	Data				
	Fevereiro	Março	Maio	Julho	Outubro
	0,50	0,09*	0,15*	0,21	0,01
	0,53	0,23	0,31	0,03 *	0,26
	-	0,04*	0,14*	0,03*	0,42
	-	0,18*	0,38	0,16*	0,01
	-	-	-	0,29	0,30

<b>Valores de Referência</b>
<b>0,2 - 0,6 mgCL<sub>2</sub>/L</b>

\*Valores fora dos parâmetros referentes aos valores de referência



**Figura 34- Níveis de Cloro Analisados**


Para além do cloro introduzido na água da rede pela entidade responsável pelo tratamento de águas residuais da Póvoa de Santa Iria, a DanCake contrata uma empresa certificada para o controlo de qualidade da água que abastece os pontos de água de toda a fábrica. Assim, esta entidade tem o objectivo de introduzir num local adequado para o efeito, uma certa quantidade de hipoclorito de modo a garantir uma concentração de cloro recomendável em toda a larga distância entre tubagens. Este tratamento adicional tem em conta a grande volatilidade do cloro e tem como objectivo garantir uma concentração de cloro suficiente ao longo de todas as tubagens que percorrem a instalação fabril, de modo a assegurar uma qualidade da água em todos os pontos de abastecimento de água.


Assim, tendo em conta que é adicionada uma quantidade de cloro na água da rede, para testar a contribuição dos níveis de cloro no aumento do 3-MCPD, decidiu-se incluir nas receitas que vão ser elaboradas a nível piloto, a adição de uma quantidade conhecida de hipoclorito (2g).


- Origem da Gordura (Óleo de Palma):** Nas receitas em questão, este ingrediente representa cerca de 2% a 3% do total da receita. Para além disso, o óleo de palma confere características ao produto que são essenciais para a garantia de muitas das suas qualidades organolépticas. No entanto, já está a ser testada a hipótese da substituição do mesmo por óleo de girassol, por parte da empresa. Para saber o grau de importância do óleo de palma na formação de 3-MCPD, vão-se testar vários níveis /padrões em receitas de fábrica piloto:

- 1. Receita Standart:** Com óleo de palma (valor já presente em receita).
- 2. Receita Misto:** Visto que a quantidade de gordura na receita tem que se manter sempre a mesma, irá ser reduzida para metade a quantidade de óleo de palma adicionada, e acrescentada essa mesma quantidade de óleo de girassol, satisfazendo a quantidade de gordura pretendida.
- 3. Receita Sem Óleo de Palma:** Este ingrediente é retirado na totalidade da receita, sendo que a quantidade retirada é acrescentada em óleo de girassol.  
É importante referir que foram feitas provas sensoriais às amostras resultantes dos ensaios industriais relativos à ausência de palma na receita, e foi concluído que embora se note alguma secura no produto, a diferença das propriedades organolépticas não é muito significativa.
- 4. Análise a uma amostra de torta de baunilha:** Embora não seja o produto em questão para análise, achou-se pertinente a análise do mesmo, já que é o único produto que na unidade

fabril da Póvoa de Santa Iria que não contém directamente na sua formulação o óleo de palma. Refere-se directamente já que é conhecido que o único ingrediente que contém uma pequena percentagem de óleo de palma é a margarina que faz parte dos ingredientes das tortas. Assim, podemos verificar se a existência de óleo de palma directamente na receita é um factor significativo ou não.

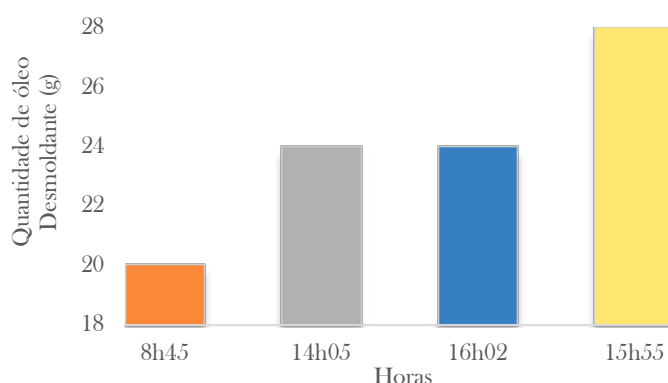
-  ○ **Origem Sal (Cloreto de Sódio):** Tendo em conta que o ião cloreto é um dos principais precursores à formação de 3-MCPD, a quantidade de sal ou de cloreto de sódio na receita foi um factor importante a ter conta. Em média, este ingrediente representa cerca de 0,4% do total da receita, o que é um valor bastante baixo. No entanto, esta variável merece especial atenção, já que segundo várias referências bibliográficas, a adição de sal e de gorduras em simultâneo é um factor com bastante contribuição para a formação de 3-MCPD. Assim, decidiu-se desenvolver uma receita em fábrica piloto onde fosse adicionada uma quantidade 2 vezes superior à que está neste momento em vigor em receita, de modo a obter uma amostra “branca” (com sal suposto) e outra “preta” (com o dobro desse valor).

-  ○ **Emulsionantes e Aromas:** Embora não seja dada uma contribuição tão relevante a este tipo de ingrediente pela bibliografia, chegou-se à conclusão que é uma sub-causa a ter em consideração. Assim, para o bolo de limão, desenvolveu-se uma receita a nível piloto sem a adição do aroma de limão que, por consequência pode estar a aumentar a acidez da massa e a aumentar o valor de 3-MCPD no produto final. A conclusão relativa ao nível de pH desta receita irá ser mencionada no ponto referente ao mesmo. Foram também elaboradas receitas onde um emulsionante denominado colco mono, foi retirado. Este emulsionante que é constituído à base de monodiglicerídeos, tem como finalidade atribuir à massa uma densidade dentro dos padrões aceitáveis da DanCake. No entanto, no seguimento dos ensaios piloto, verificou-se que é impossível atingir os valores de densidade desejados (entre 93 g e 98 g) com a ausência deste emulsionante, pelo que se a sua remoção fosse necessária, seria uma acção correctiva muito pouco provável de acontecer, já que o resultado da remoção deste emulsionante foram bolos com características esteticamente pouco atractivas. Foi também testado e provado a amostra correspondente ao bolo de limão sem aroma de limão e o resultado foi muito desapontante, já que o produto não aparentava qualquer gosto a limão, mesmo contendo na sua formulação o sumo de limão em pó.

-  ○ **Glicerina (Precursor Glicerol):** Várias pesquisas já concluíram que o glicerol é um dos fortes precursores à formação de 3-MCPD. Nas receitas dos bolos, é adicionada uma quantidade de glicerina que satisfaz em média cerca de 4%-5% da receita total. Para avaliar a contribuição deste ingrediente, foi desenvolvida uma receita onde a glicerina é totalmente retirada. No entanto, à semelhança do colco mono, os bolos resultantes desta receita, tiveram resultados esteticamente pouco atractivos, e certamente também terá afectado as suas características organolépticas, já que o bolo aparentava estar bastante seco e rijo logo após arrefecimento.

- o **Óleo Desmoldante:** Esta matéria-prima tem um elevado grau de importância no processo, já que permite que a massa cozida nas formas, desenforme na totalidade sem prejudicar o aspecto do produto final.

No entanto, o óleo desmoldante tem um elevado teor de gordura e têm na sua constituição óleo de palma. Foi então feita uma análise da variabilidade a nível industrial da quantidade injectada pela máquina nas formas durante um turno. Tendo em conta que a quantidade óptima é 24g, verificou-se que devido à incerteza da máquina injectora, o grau de variabilidade da quantidade de óleo desmoldante é extremamente elevado, como se pode verificar na figura 35.



**Figura 35- Quantidade de Óleo Desmoldante (g) vs Hora**

Há que ter em conta que uma forma contém um total de 7 divisórias correspondentes a 7 unidades individuais de bolos. Portanto nada garante que a quantidade de óleo desmoldante seja dividida equitativamente pelas 7 unidades individuais, logo desde aí pode haver uma discrepância de quantidade do mesmo, que se poderá refletir na quantidade de 3-MCPD de produto final.

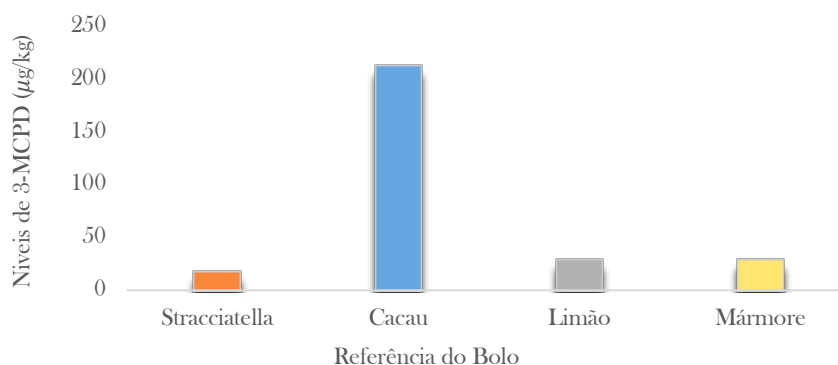
Para avaliar então a contribuição desta sub-causa na formação de 3-MCPD, procedeu-se às seguintes abordagens:

1. Em fábrica piloto, desenvolveu-se uma receita com a quantidade mínima de óleo desmoldante (22g) e com o triplo da quantidade standart (3x24g) ou seja, com 72g no total. Nesta abordagem, o peso é controlado e igualmente dividido pelas 7 unidades individuais;
2. Na análise laboratorial aos bolos provenientes das receitas descritas no ponto anterior, durante o processo de extracção, teve-se o cuidado de selecionar a parte que está em contacto com a forma, de modo a avaliar a contribuição do óleo desmoldante na crosta do bolo.
3. Para avaliar a contribuição da absorção da gordura do óleo desmoldante por parte do bolo, foi também incluída uma parte do miolo.

Verificou-se durante a elaboração deste tipo de receita que as amostras com o triplo do óleo resultavam num bolo extremamente gorduroso, e que a quantidade mínima de óleo desmoldante era suficiente para que o produto fosse desenformado sem qualquer dificuldade.

- o **Cacau:** Segundo a literatura, as gorduras provenientes do cacau não são por si só, uma fonte adicional á formação de 3-MCPD.

Após a recolha de todos os boletins analíticos presentes em histórico dos bolos em questão, procedeu-se ao registo de todos os resultados, efectuando-se assim uma média de valores de 3-MCPD para cada receita no âmbito de construir um diagrama que ajudasse a verificar qual era a receita com maior incidência de altos níveis de 3-MCPD.



**Figura 36- Média de Níveis de 3-MCPD em cada tipo de Receita (µg/kg)**

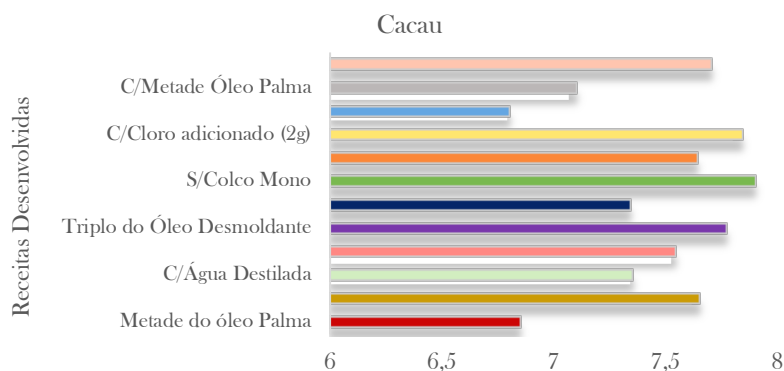
Como se pode verificar na figura 36, a receita de Cacau apresenta um valor de 3-MCPD bastante mais elevado que as restantes.

Para avaliar então a contribuição que o cacau possa ter neste tipo de receita, procedeu-se à análise desta matéria-prima, no âmbito de poder tirar alguma conclusão relativa à mesma.

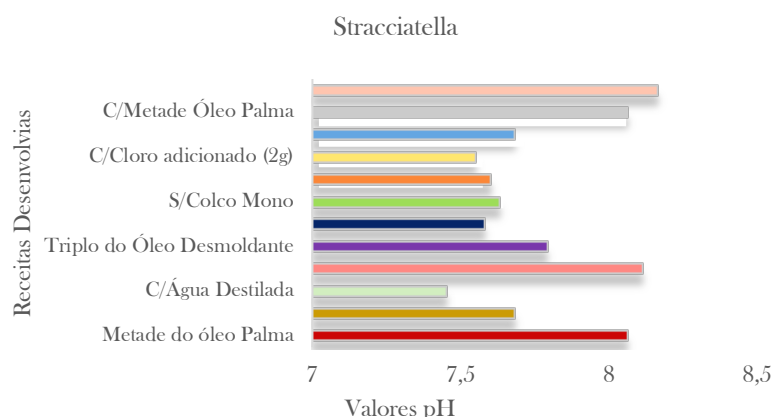
Análises ao pH deste tipo de massas também levantaram algumas dúvidas em relação a este tipo de ingrediente, como pode ser observado mais adiante.

### 5.2.2 Outras Variáveis

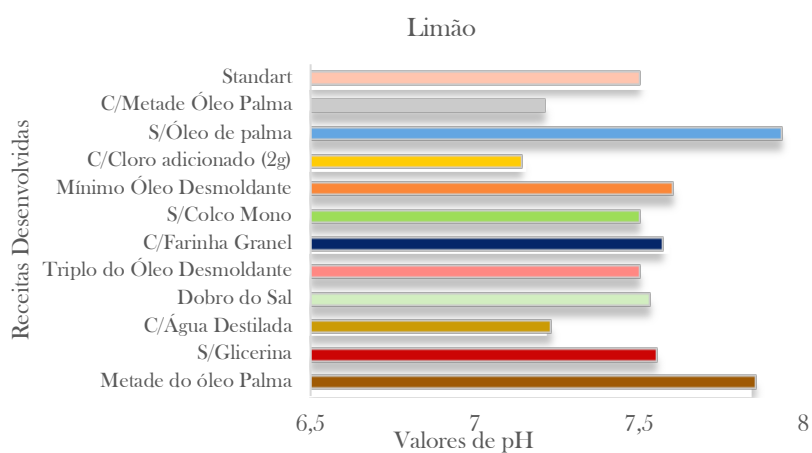
- **pH das Massas:** Através da pesquisa bibliográfica chegou-se à conclusão que a cinética da reacção de formação de 3-MCPD é desencadeada principalmente por níveis de pH baixos (iguais ou inferiores a 6). Para saber se esta sub-causa estaria a afectar os níveis de 3-MCPD no produto final, efectuou-se a análise e registo de pH de cada massa efectuada em fábrica piloto, tendo-se obtido os seguintes resultados apresentados nas figuras 37, 38 ,39 e 40:



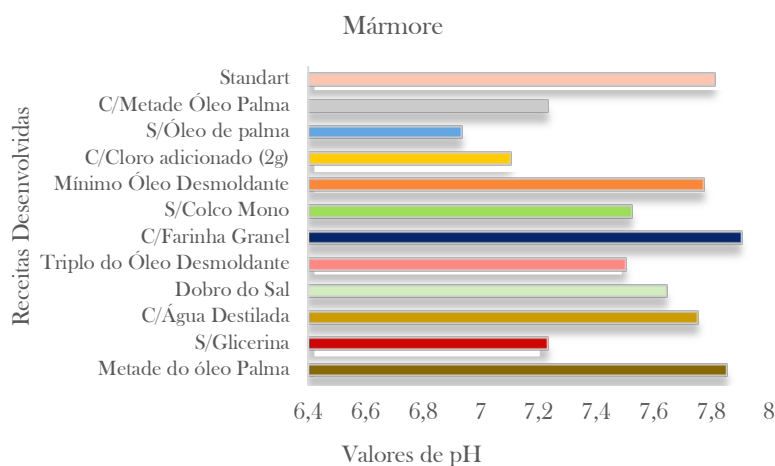
**Figura 37- Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Cacau**



**Figura 38 -Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Stracciatella**



**Figura 39 -Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Limão**



**Figura 40- Gama de pH's das Receitas de Fábrica Piloto de Mármore**

Na referência mármore, foi ainda efectuado o controlo de pH da massa mármore e do respetivo óleo mármore, tendo sido obtidos os seguintes resultados:

- pH Massa Mámore (Massa standart + óleo de Mármore): 7,90
- pH Óleo Mármore : 8,42



Como se pode observar, as gamas de pH registadas em ambas as referências nunca atingem valores iguais ou inferiores a 6 unidades, portanto não se pode considerar que esta variável seja decisiva no que toca aos altos níveis de 3-MCPD nos bolos.

Inicialmente, pensou-se que a referência de Limão por conter na sua formulação ingredientes que lhe poderiam conferir uma acidez adicional, apresentasse valores de pH significativamente mais baixos que as restantes referências. No entanto, no seguimento da análise da figura 38 podemos verificar que à semelhança das restantes referências, nenhum valor atinge gamas inferiores a 7 unidades, logo pode-se concluir que o pH no caso em estudo, não é um factor precursor à formação de 3-MCPD no produto final. No entanto, pode-se verificar que é na receita de chocolate que se registam valores mais baixos de pH, o que conduz a uma maior atenção ao cacau como ingrediente.

- o **Valores baixos de  $a_w$ :** Segundo diversas fontes, valores baixos de  $a_w$  estão associados a altos valores de 3-MCPD. Estes valores podem estar associados à presença de teores elevados de gordura e/ou açúcares que em maiores quantidades promovem valores mais baixos de  $a_w$  e por consequência, uma maior probabilidade de formação de 3-MCPD.

A adição de quantidades significativas de açúcar (que representam em média cerca de 24% do total da receita), vai influenciar nos valores do teor de água livre no produto final, permitindo que este valor não seja muito alto. A adição de grandes quantidades de açúcar ajuda não só na consistência e volume do produto, bem como no aumento da validade do mesmo, já que induz a um teor de água livre mais baixo, e por consequência causa um ambiente menos propício ao desenvolvimento microbiológico.

Assim, dado que o cliente exige a ausência do maior número possível de aditivos alimentares, a data de validade do produto não é muito prolongada (77 dias).

Na medida que este produto se destina a exportação para a Alemanha, há que garantir que este chega ao destino em condições para ser consumido e para isso, os valores de  $a_w$  precisam de estar dentro dos parâmetros não podendo haver muita oscilação do mesmo.

Portanto, inicialmente esta poderia ser uma variável a ter conta. Porém não existe muita flexibilidade para a mudança da mesma.

### 5.2.3 Fornecedores

- o **Epíclorodrina:** Este composto, sendo proveniente de resinas de papel de revestimento com resistência à humidade, pode conduzir à migração do 3-MPCD para o alimento revestido através da sua reacção com a molécula de água.

Para averiguar a sua presença nos materiais de embalagem em questão, foram feitos contactos ao fornecedor de material de embalagem do produto em questão, para averiguar se tinham conhecimento da presença de epíclorodrina. No entanto, foi referido que não existe conhecimento da existência do mesmo nos materiais de embalagem utilizados no produto alvo de estudo.

- o **Outros Problemas Relacionados Com Fornecedores:** Desde que foi detectada a problemática da presença de altos níveis de 3-MCPD, a DanCake tem tido a preocupação de contactar os fornecedores de algumas matérias-primas, nomeadamente os fornecedores de gorduras como o óleo

desmoldante, no âmbito de requerer alguma tentativa de melhoria de processo no que toca à redução da presença deste composto nesta matéria-prima. No caso do óleo desmoldante em pó usado nas tostas, já foi possível o desenvolvimento de um produto com um valor mais baixo de 3-MCPD.

#### 5.2.4 Processo:

- o **Temperaturas altas:** Temperaturas altas (entre os 100°C-230°C) são um factor precursor para a formação de 3-MCPD. É sabido que no processo em causa, como se trata de um processo de *baking* esta gama de temperaturas é atingida facilmente.

No entanto, é também sabido que existe também uma relação da degradação do mesmo a partir de uma certa gama específica de temperaturas elevadas, juntamente com condições de basicidade adequadas.

No entanto, a implementação de medidas correctivas nesta sub-causa não são aplicáveis uma vez que iria implicar mudanças muito drásticas a nível de processo que poderiam não só afectar o rendimento e cadência da linha, bem como as características organoléticas do produto.

- o **Tempos de Cozedura:** Esta sub-causa está associada também à temperatura, já que são linearmente dependentes. Se o tempo de cozedura fosse alterado, então a temperatura consequentemente também teria que ser, o que iria provocar uma alteração a nível de rendimento mássico e energético da linha. Embora se saiba que tempos longos de cozedura associados a altas temperaturas como as do processo de *baking* podem induzir ao aumento da formação de 3-MCPD, no caso em estudo em concreto, nenhuma acção correctiva pode ser implementada neste âmbito.

- o **Lavagem das Formas:** No seguimento do acompanhamento de um ensaio a nível industrial dos bolos de chocolate requerido pelo cliente, foi verificada a existência desta potencial sub-causa para a formação de 3-MCPD no produto. Após todo o processo de fabrico associado aos bolos, as formas são enxaguadas através de um jacto de água no âmbito de retirar o óleo desmoldante ainda presente. Após a análise do tanque de armazenamento de água verificou-se que o aspecto da mesma apresentava bastante acumulação de gordura, e que a recirculação da água é feita num circuito fechado ou seja, a mesma água que efectua a lavagem das formas é recolhida e armazenada nesse mesmo tanque, para seguidamente ser usada na lavagem seguinte.

Após a abordagem do chefe de linha, verificou-se que o procedimento existente para a mudança desta mesma água presente no tanque é com a frequência de 1 vez por turno.

Após esta verificação, estabeleceu-se uma análise a esta mesma água de lavagem no início, no meio e do fim do turno, para poder averiguar as quantidades de gordura presentes na água em ambas as etapas do processo. Há que ter em conta que se a quantidade de gordura presente na água for significativamente elevada, existe uma acumulação de gordura não só devido à água de enxaguamento, bem como ao óleo desmoldante que é posto por defeito na etapa seguinte do processo. Devido a este facto, durante a pesagem das formas vazias (isentas quer de produto quer de óleo desmoldante) no âmbito da tara da balança, verificou-se que as formas apresentavam estar com nível de gordura elevado,

o que nos leva a concluir que ao longo do turno, irá haver uma taxa de acumulação exponencial de gordura nas mesmas, que consequentemente vai resultar na concentração de gordura do produto final. Há que referir que durante o processo de extracção efectuado a esta variável se verificou um nível de gordura extraída, muito semelhante à extraída das amostras de bolos para a mesma quantidade em massa (g).

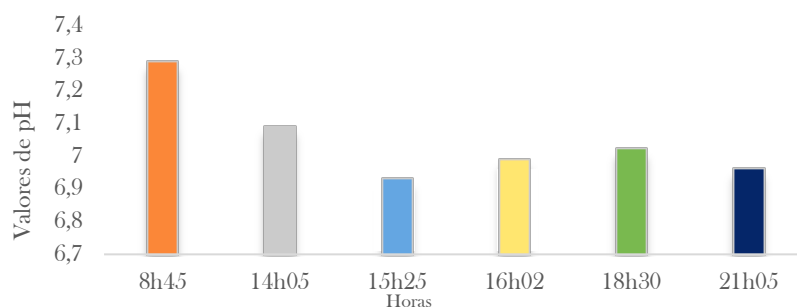
- o **Acumulação de Massas nas Tubagens do Depósito Intermédio:** Também no seguimento do acompanhamento do ensaio industrial já mencionado em alguns pontos acima, verificou-se que esta pode ser uma variável que promove o aumento da formação de 3-MCPD.

Na linha dos bolos, a formação dos mesmos começa na zona de massas os ingredientes são sequencialmente introduzidos numa batedeira (uns automaticamente e outros manualmente), seguindo uma sequência de passos e de batimentos.

Após este passo estar concluído, a massa é enviada para um depósito intermédio com a ajuda de uma bomba que ajuda na subida pela tubagem para ser posteriormente colocada nas formas que já foram previamente pulverizadas com óleo desmoldante. Nesta mesma tubagem, como existem várias massas a elaborar por turno, é provável que entre o mesmo turno exista a acumulação de massas anteriores que possam contaminar a massa que está em execução. Desta contaminação resulta uma diminuição de pH da massa actual, já que a fermentação de massas acumuladas anteriormente induz a gamas de pH progressivamente mais baixas.

É de notar que a lavagem completa quer do depósito intermédio quer das duas tubagens é elaborada ou no final do turno, ou se dentro do mesmo turno, estiver planeada para limpezas por sequências produtivas (por exemplo no caso de possíveis alergénios).

Tal se pode verificar pelo registo de pH das diferentes massas no mesmo turno:




**Figura 41- Hora vs pH das Massas da Receita Standart**

Tendo em conta que a fábrica labora a 3 turnos e que estes são:

1. Das 7h30-15h30;
2. Das 15h30-23h30;
3. Das 23h30-7h30;

Então podemos concluir que no decorrer do primeiro turno se regista para a mesma receita, um decréscimo dos valores de pH das massas com o decorrer do tempo. No entanto, não foram alcançados valores considerados críticos para a formação de 3-MCPD, já que todos os resultados ultrapassam a gama dos 6 valores.

### 5.2.5 Outras Variáveis

-  ○ **Factor erro associado ao boletim analítico:** Segundo o artigo *Ergänzende Hinweise zu den DGF-Einheitsmethoden C-VI 17 (10) und C-VI 18 (10) zur Bestimmung der 3-MCPD- und Glycidyl-Ester* [58], o grau de incerteza associado ao método analítico usado para a quantificação de 3-MCPD na forma livre e esterificada denominado por DGF C-VI 18 (10) ou método de *Kühlmann* é de cerca de 20% a 40%. Foi inclusivamente verificado este tipo de erro para uma amostra de bolo de limão enviado para o laboratório antes do decorrer desta dissertação. A primeira amostra veio não conforme, tendo-se recorrido à repetição da mesma que posteriormente deu conforme.

### 5.3 Análise dos Resultados Obtidos Por GC/MS Dos Bolos *Luxury* Preparados em laboratório

Baseado nas referências bibliográficas, há indícios que indicam que a presença de variáveis como o óleo de palma, glicerina, óleo desmoldante e de cloro na receita, são factores percursores ao aumento da concentração de 3-MCPD no produto final.

Nas matérias primas que puderam ser analisadas, em nenhuma delas se verificou a presença elevada da concentração final do composto.

Segundo os resultados obtidos, e em análise às tabelas 8,9,10 e 11 registaram-se valores mais críticos de concentração de 3-MCPD na referência de Stracciatella, nomeadamente nas receitas onde se regista a ausência dessas variáveis consideradas críticas (resultados a vermelho)

Porém, é de realçar que o método não foi completamente validado, já que faltou realizar nomeadamente ensaios de exatidão, baseados por exemplo em ensaios de recuperação que permitam não só validar a exatidão do método, mas também a validação do modo de realização de extracção.

**Tabela 9- Resultados Obtidos por GC/MS da Referência de Limão**

Limão	Metade óleo palma	—
	Com Cloro (2g)	< LOD
	Sem óleo palma	160
	Sem Colco Mono	719
	Sem aroma	< LOD
	Com água Destilada	2
	Triplo Limão em Pó	6
	Mínimo Óleo Desmoldante	35
	Triplo Óleo Desmoldante	295
	Sem Glicerina	< LOD
	Farinha Granel	< LOD
	Standart	959
	Dobro do Sal	3

**Tabela 8- Resultados Obtidos por GC/MS para a Referência de Stracciatella**

Stracciatella	Metade óleo palma	2869
	Com Cloro (2g)	21
	Sem óleo palma	3393
	Sem Colco Mono	—
	Com água Destilada	2391
	Mínimo Óleo Desmoldante	2038
	Triplo Óleo Desmoldante	47
	Sem Glicerina	729
	Farinha Granel	50
	Standart	568
	Dobro do Sal	27

**Tabela 10- Resultados Obtidos por GC/MS para a Referência de Cacau**

Cacau	Metade óleo palma	28
	Com Cloro (2g)	136
	Sem óleo palma	156
	Sem Colco Mono	37
	Com água Destilada	66
	Mínimo Óleo Desmoldante	61
	Triplo Óleo Desmoldante	157
	Sem Glicerina	—
	Farinha Granel	66
	Standart	397
	Dobro do Sal	24

**Tabela 11-Resultados Obtidos por GC/MS para a Referência de Mármore**

Mármore	Metade óleo palma	—
	Com Cloro (2g)	108
	Sem óleo palma	254
	Sem Colco Mono	253
	Com água Destilada	1087
	Mínimo Óleo Desmoldante	140
	Triplo Óleo Desmoldante	< LOD
	Sem Glicerina	239
	Farinha Granel	—
	Standart	47
	Dobro do Sal	—

**Tabela 12- Resultados Obtidos por GC/MS para as Matérias-Primas**

Matérias Primas	Água lavagem formas	< LOD
	Cacau DB11	< LOD
	Cobertura de chocolate	21
	Óleo desmoldante	—
	óleo de palma	—

**<LOD-** Valor abaixo do Limite de Detecção

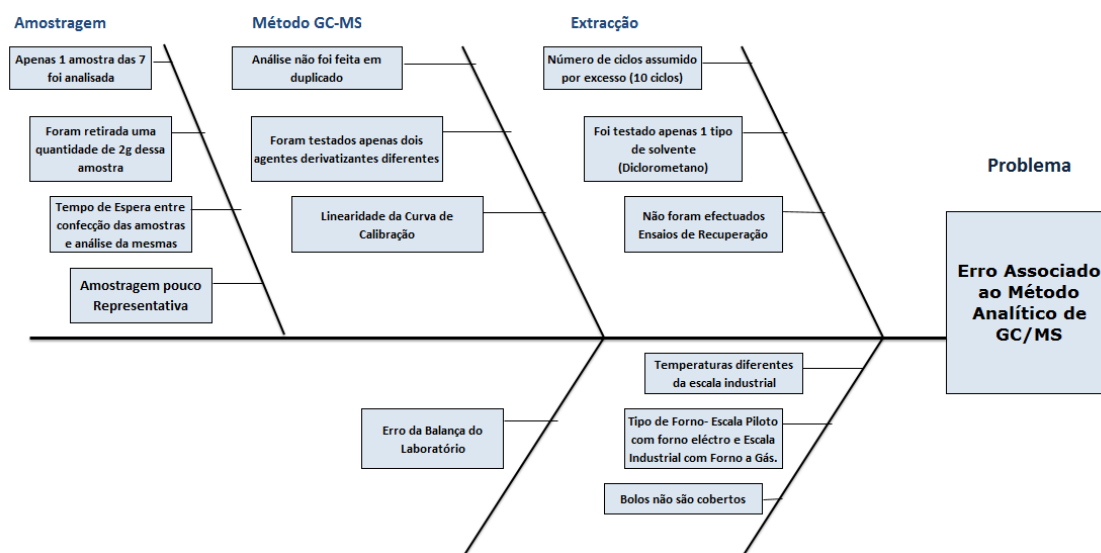
- Resultado Conforme (< 240 ppb)
- Resultado Não Conforme, porém, poderá haver conformidade tendo em conta a análise de erro associada
- Resultado Não Conforme ( >240 ppb (muito acima) )

**Nota: Os valores que se encontram rasurados, indicam que a sua análise não foi realizada devido a factores externos.**

A figura 42 mostra o diagrama causa efeito referente as fontes de erro do método, sendo que estas fontes de erro não foram teoricamente validadas neste ensaio.

Existe por isso, uma série de factores que contribuem para a existência de erro associado à determinação de 3-MCPD por GC/MS. O facto de o método não estar completamente validado, implica a falta de realização de alguns passos que podem estar a contribuir em conjunto ou individualmente, para o erro associado ao método analítico por GC/MS.

No entanto, devido a factores associados ao erro, estes resultados incluindo os valores obtidos, podem não ser conclusivos.



**Figura 42- Diagrama de Ishikawa referente ao erro associado às análises**

Como se pode verificar na figura 42, existem uma série de factores que podem estar a influenciar os resultados finais acima obtidos.

- **AMOSTRAGEM:**

- **Apenas uma das 7 divisórias foi analisada:** No decorrer dos ensaios Piloto, as várias massas elaboradas para as diferentes receitas das várias referências, foram colocadas em formas iguais às usadas industrialmente. Estas formas, possuem um total de 7 divisórias, sendo a massa distribuída equitativamente pelas mesmas divisórias (325g para cada divisória).  
Para análise, por uma questão de gestão de tempo e por uma questão de dimensão amostral, foi usado apenas 1 amostra de bolo de cada receita de cada referência (ou seja, apenas o resultado de uma divisória de cada receita para cada referência). Embora a massa seja homogênea e distribuída equitativamente pelas 7 divisórias, por uma questão de homogeneidade amostral e no âmbito de atribuir uma melhor representabilidade ao método, e para um maior rigor de análise, uma quantidade estabelecida devia ter sido retirada de cada uma das 7 divisórias para cada receita de cada referência.
  - **Foi retirada uma quantidade de 2g dessa amostra:** No desenvolvimento do protocolo relativo ao processo de extracção, e com base no artigo *Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1,3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS* by Sameer Abu-El-Haj, Maciej J. Bogusz<sup>\*</sup>, Zuhoor Ibrahim, Huda Hassan, Mohammed Al Tufail, retirou-se de cada amostra 2g. Para validação do método de extracção, deveriam ser testadas maiores quantidades de amostras extraídas.
  - **Tempo de espera entre a confecção das amostras e análise das mesmas:** Durante este estudo, o intervalo de tempo entre a confecção e a análise das amostras foi de cerca de 2 meses. Portanto, seria recomendado a elaboração de um estudo de cinética de formação e/ou de degradação do 3-MCPD com a temperatura e humidade.
- **MÉTODO DE GC/MS:**
    - **Análise não foi feita em duplicado:** Por motivos de gestão de tempo e ocupação do aparelho, as análises por GC/MS às amostras extraídas apenas puderam ser feitas uma única vez. No âmbito de atribuir uma melhor homogeneidade e análise comparativa ao método, seria recomendado a elaboração de análises pelo menos em duplicado.
    - **Apenas foram testados dois agentes derivatizantes diferentes:** Relativamente à derivatização, primeiramente, foi usada a hipótese de poder quantificar o composto sem ter de recorrer ao passo de derivatização. No entanto, posteriormente verificou-se não ser possível. Após este passo e segundo uma fonte bibliográfica citada no ponto ***Materiais e Métodos***, recorreu-se a adição do passo de derivatização com HFBA. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios, tendo demonstrado áreas de pico pouco rasoáveis para amostras derivatizadas.  
De seguida, testou-se outro agente derivatizante que segundo várias fontes bibliográficas [6,51-52], demonstra um melhor desempenho relativamente ao HFBA, tendo-se já obtidos resultados coerentes com uma amostra derivatizada.  
No entanto, seria benéfico testar vários tipos de agentes derivatizantes diferentes no âmbito de concluir qual demonstraria uma maior taxa de rentabilidade da reacção de derivatização.

- **Linearidade da Curva de Calibração:** Verificou-se a ausência de linearidade na curva de calibração, que pode estar associada a alguma espécie de erro no processo de derivatização. Para aumentar esta linearidade, deveriam ter sido feitas pelo menos 4 curvas de calibração, ao contrário das 2 que foram efectuadas.

#### **MÉTODO DE EXTRACÇÃO:**

- **Número de Lavagens:** No âmbito de garantir a melhor extracção possível, assumiu-se um número de lavagens de 10, valor que foi decidido por excesso, sem implicação de validação do mesmo. Há que referir que este valor pode não ser o mais indicado para a extracção bem sucedida de 3-MCPD em amostras sólidas.  
Portanto, para uma melhor compreensão da influência do número de lavagens na extracção do composto do produto final, dever-se-ia testar um número maior de lavagens.
- **Solvente:** Seguindo o artigo referenciado, *Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1,3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS* by Sameer Abu-El-Haj, Maciej J. Bogusz<sup>\*</sup>, Zuhoor Ibrahim, Huda Hassan, Mohammed Al Tufail, utilizou-se como solvente o diclorometano.  
No entanto, existe referência que o composto é solúvel em solventes com polaridade alta como o metanol, etanol, clorofórmio e etil-acetato e também em água[6]. Portanto, seria um factor a ter em conta testar a extracção com diferentes tipos de solventes.
- **Ensaio de Recuperação:** Devido à ausência de tempo directamente ligada à dimensão amostral, não foi possível a elaboração de ensaios de recuperação, tendo-se assumido que a taxa de recuperação é similar à referida no artigo *Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1,3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS* by Sameer Abu-El-Haj, Maciej J. Bogusz<sup>\*</sup>, Zuhoor Ibrahim, Huda Hassan, Mohammed Al Tufail, ou seja de cerca de 80%.
- Este tipo de ensaios de recuperação deveriam ser efectuados, elaborando um processo de *spike* de uma quantidade conhecida de 3-MCPD padrão directamente na amostra que irá ser extraída.

#### **MEDIÇÕES:**

- Tendo em conta que a nível industrial as medições são feitas manualmente e por descarga automática, existe sempre um factor erro associado a ambas.

Embora o erro da balança não seja considerado muito crítico, é um factor a ter em conta.

**Nota: A nível piloto, as medições dos ingredientes foram feitas sempre manualmente e sempre pela mesma pessoa.**



### **LABORATÓRIO PILOTO:**

- **Temperaturas diferentes da escala industrial:** Devido à diferença de fornos utilizados e também ao meio envolvente em si, as temperaturas a nível industrial são sempre mais elevadas que as atingidas em escala piloto;
- **Diferentes tipos de Forno:** O perfil de forno a nível laboratorial é muito diferente do forno industrial. O primeiro é um forno elétrico, enquanto que o forno industrial é um forno a gás, atingindo um perfil de temperaturas que não pode ser equiparado.
- **Bolos não são cobertos:** As amostras elaboradas em escala piloto não são cobertas, isto porque a cobertura deste tipo de produto é apenas possível à escala industrial. Devido a uma questão de planeamento e organização da própria linha, era impensável a cobertura de tanta amostragem.

## **5.4 Possíveis Acções Correctivas**

Segundo algumas fontes bibliográficas e não provenientes dos resultados acima obtidos através do método de GC/MS, existem algumas medidas correctivas aplicáveis a nível produtivo que ajudam no decréscimo do nível de 3-MCPD no produto final [11]:

- Elevação do pH dos alimentos com alto teor de humidade
- Evitar a exposição de produtos com baixo teor de água livre a tratamentos de alta temperaturas;
- Limitação da quantidade de glicerol nos alimentos produzidos durante a suas etapas de preparação e armazenamento;
- Evitar o uso de aditivos alimentares, nomeadamente glicerídeos parciais;
- Implementação da acção de confirmação da pureza dos aditivos alimentares usados;
- Evitar a exposição de lípases já que podem ocorrer as situações seguintes:
  - Clivagem de ésteres de 3-MPCD em produtos tratados termicamente;
  - Libertação de glicerol e glicerídeos parciais de glicerolípidos em etapas como o pré-cozimento;
- Triagem de materiais que estejam em contacto com produtos precursores de formação de 3-MCPD.
- Adição de agentes redutores como a cisteína, glutatona ou proteínas ricas;

No entanto, nem todas as acções correctivas são aplicáveis no caso em estudo, já que metem em causa a qualidade do produto final.

Dentro dos possíveis acções correctivas a implementar no caso em estudo podemos referir os seguintes aspectos:

- Substituição mais regular da água de lavagem das formas (pelo menos duas vezes por turno);
- Calibração da máquina injectora de óleo desmoldante- De modo a poder ter um maior rigor na quantidade pulverizada nas formas;

- Diminuição da quantidade de glicerina na receita;
- Substituição completa do óleo de palma por outro óleo de origem vegetal;
- Estudar a hipótese de redução de alguns aditivos e emulsionantes;
- Utilização de óleo desmoldante com baixo teor de 3-MCPD;
- Utilização de óleo de palma com baixo teor de 3-MCPD;

## 6. TRABALHO FUTURO

---

No decorrer desta dissertação, estabeleceu-se uma diversidade de tópicos que deverão ser explorados em investigações futuras tais como:

### 1. AMOSTRAGEM:

- a. **Maior Homogeneidade de Amostras:** Considerando a recolha para extracção de uma dimensão de amostras maior;
- b. **Considerar a possibilidade de cobrir as amostras:**

### 2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRACÇÃO:

- a. **Teste de vários Solventes:** No âmbito da verificação da eficácia de cada um deles, e concluir qual o mais rentável para a extracção de 3-MCPD em produtos alimentares;
- b. **Elaboração de Ensaios de Recuperação:** Com a elaboração de *dopagem* na amostra a ser extraída, de modo a verificar a taxa de recuperação do método de extracção (deve estar compreendida entre os 80 e os 120%) e posterior análise de GC/MS.
- c. **Teste de vários Tempos de Extracção/ Números de Lavagem:** Para ter conhecimento da variação da taxa de recuperação com o nº de ciclos/tempos de extracção, este ensaio deve ser elaborado.

### 3. EXACTIDÃO DO MÉTODO DE GC/MS:

- a. **Linearidade Da Curva de Calibração:** Efectuar um maior número de ensaios relativos á elaboração da curva de calibração (elaborar pelo menos 4 curvas para a curva de calibração final).
- b. **Teste de outros agentes derivatizantes:** Existem outros tipos de agentes derivatizantes que a bibliografia indica serem eficazes no processo de derivatização de 3-MCPD.  
  
Um deles é o HFBI, que já tem demonstrado ser um excelente agente derivatizantes, ao contrário da sua alternativa mais económica HFBA.  
  
No entanto, este tipo de verificação deve ser feita para a ampla gama de solventes em que o 3-MCPD demonstra boa solubilidade.
- c. **Maior reprodutibilidade nas Análises de GC/MS-** Para obter um maior rigor nas análises e respectivos resultados, as injeções das amostras no aparelho devem ser efectuadas em duplicado.
- d. **Testar outras instruções de derivatização:** Este estudo teve como base um artigo referenciado em [52], que ditava condições de reacção de derivatização de 60°C durante 70 minutos para este agente de derivatização.

Outros tipos de condições de derivatização para este mesmo agente derivatizante devem ser testadas.

#### **4. ELABORAÇÃO DE ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DO 3-MCPD COM A TEMPERATURA;**

#### **5. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO COMPOSTO COM A HUMIDADE;**

Em modo conclusivo, é muito importante a validação quer do método analítico de GC/MS quer do método de extracção.

Novos ensaios com outros tipos de solvente e de agentes derivatizantes devem ser realizados, bem como a realização de novos ensaios experimentais à escala piloto.

## 7. CONCLUSÕES

---

No decorrer desta dissertação obteve-se que uma grande variabilidade associada à quantificação de 3-MCPD no produto final.

A nível processual, foi perceptível que alguns tipos de variáveis são consideradas fixas e independentes e por isso, é difícil a alteração das mesmas. Foram acompanhadas várias produções das amostras de bolos citadas, uma das quais incluiu um ensaio a nível industrial de bolos com a ausência de óleo de palma na sua receita. Neste ensaio, conseguiu-se provar que a acumulação de resíduos provenientes de massas anteriores nos tubos do depósito intermédio é um factor que influencia o pH das massas consequentes, atribuindo-lhes um valor mais baixo, ou seja as massas vão ficando cada vez mais acidificadas devido ao processo de fermentação que inevitavelmente ocorre às temperaturas do ambiente de produção. No entanto, foi também concluído que mesmo tendo em conta a acidificação das massas no decorrer dos turnos, os valores mais baixos atingidos não são valores críticos para a formação de 3-MCPD, já que não se registaram a nível de produção valores inferiores a pH 6, tendo-se verificado o mesmo nas receitas desenvolvidas à escala piloto.

Outro factor que poderá ter influência no aumento da concentração final de 3-MCPD no produto final, é o baixo teor de água livre do produto. Embora nos critérios estabelecidos na empresa, este valor não seja considerado baixo (tendo em conta produtos secos como por exemplo tostas e *crackers*) a nível analítico, pode ser considerado um valor baixo. No entanto, como neste tipo bolos existe uma quantidade nula de aditivos alimentares assim exigida pelo cliente em questão, o valor baixo de  $a_w$  (tendo em conta o produto em causa), tem como função garantir a sua validade e características organolépticas para que estes se mantenham em conformidade com as exigências do cliente.

Também ficou provado que existe uma contaminação por parte das matérias-primas que contenham na sua formulação óleo de palma, quer directamente quer indirectamente. Em particular, destaca-se o óleo desmoldante que também provou possuir uma ampla variabilidade na sua quantidade durante a produção, que ficou provada com pesos dispares do mesmo em diferentes tempos de processo.

A água de lavagem das formas também foi um factor que levantou preocupações devido à periodicidade da sua substituição. Concluiu-se que o procedimento actual para a substituição da mesma é uma vez por turno. No entanto, este tipo de procedimento parece não ser suficiente já que esta aparenta ter uma concentração muito elevada de gordura, que por sua vez em contacto com a superfície do bolo, poderá estar a influenciar o seu teor lipídico e consequentemente, a concentração de 3-MCPD.

Em laboratório piloto, efectuou-se os ensaios de 46 receitas de bolos das 4 referências para se averiguar qual a principal causa no aumento de 3-MCPD no produto final. No desenrolar destes ensaios testou-se a influência da glicerina, do óleo de palma, do teor de sal e de cloro, do tipo de farinha e dos respectivos emulsionantes e aromas.

Conforme se foi testando algumas variáveis foi concluído que mesmo que uma determinada matéria-prima seja a principal causadora do aumento de 3-MCPD numa amostra de bolo, não existem muitas alternativas na substituição da mesma, pois o produto final não apresenta as características de qualidade exigidas pelo cliente, não podendo posteriormente seguir para consumidor.

A nível de material de embalagem, descartou-se a hipótese de a epiclorodrina ser a causadora da migração de 3-MCPD para o produto final. Foi estabelecido contacto com o fornecedor que garantiu que o material

de embalagem deste tipo de produto está controlado segundo a legislação aplicável a este tipo de compostos, pelo que a epiclorodrina não apresenta qualquer risco a nível de migração de 3-MCPD para o produto final.

No decorrer das análises laboratoriais às amostras de bolos desenvolvidas, foi concluído que a análise por GC/MS é dificultada pela polaridade e volatilidade do 3-MCPD em si.

Foi também estudada a hipótese de efectuar a análise de GC/MS ao composto sem ter que recorrer ao passo de derivatização. No entanto, a baixa volatilidade e alta polaridade características dos cloropropanóis, conduzem a altas e favoráveis interações entre a fase sólida da coluna do GC que resultam em picos com áreas muito pobres, resultando numa sensibilidade muito baixa. O composto só foi quantificável até à concentração de 10 ppm, valor que está acima do limite de especificação (240 ppb).

Recorreu-se posteriormente ao passo de derivatização com o agente derivatizante HFBA, tendo-se concluído que embora este agente derivatizante seja uma alternativa mais barata ao famoso e eficaz HFBI, não é o agente mais adequado para a derivatização de cloropropanóis, refletindo-se em resultados com um *ratio* sinal-ruído baixo e com baixa sensibilidade para um composto derivatizado.

Foi também verificado que as abundâncias dos iões característicos eram baixas e, além disso, este tipo de derivatizantes são muito sensíveis à humidade, criando dificuldades para realizar posteriormente o processo de derivatização, sendo o processo de secagem neste caso, um factor crucial. Por isso, em alternativa utilizou-se o agente derivatizante BSTFA em modo SIM e Full-Scan, onde se obteve áreas de pico bastante mais significativas, correspondendo a uma melhor sensibilidade do método de análise. Foram obtidos um LOD de 1ppb e um LOQ de 1 ppb, sendo importante realçar que será necessária uma futura validação baseada em ensaios de precisão intermédia.

Relativamente aos resultados obtidos das várias amostras de bolos e matérias-primas associadas analisadas, devido ao factor erro que pode estar associado ao método analítico, estes não podem ser considerados conclusivos.

As receitas de Stracciatella apresentaram valores mais altos que as outras. No entanto deve-se realçar que estes resultados preliminares, mostram a necessidade de efectuar mais estudos de validação do processo de extracção e do método GC/MS, bem como proceder à realização de mais ensaios à escala piloto e à escala industrial, nomeadamente estudos cinéticos de degradação e formação do 3-mcpd, quer na sua forma livre quer nas diversas formas esterificadas.

As variáveis que supostamente seriam precursoras do aumento da concentração do composto no produto final, estão a comprovar serem causadoras da diminuição do mesmo. Isto é, inicialmente pensar-se-ia que ingredientes como o óleo de palma, o óleo desmoldante, o cloro presente na água e a glicerina estando presentes na receita do produto, poderiam de alguma forma estar a influenciar o aumento da concentração do mesmo no produto final. No entanto, os resultados demonstraram que, em concreto na receita de Stracciatella, a ausência destes compostos parece estar de alguma forma (em conjunto ou individualmente), a causar a diminuição/degradação do mesmo.

Contudo, estes resultados não são conclusivos, e um estudo futuro mais aprofundado deve ser aplicado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. P. Ariseto, P. F. C. Marcolino, E. Vicente, e K. A. Sampaio, «Ésteres de cloropropanóis e de glicidol em alimentos», *Quim. Nova*, vol. 36, n. 9, pp. 1406–1415, 2013.
- [2] C. Hamlet, P. Sadd, e C. Crews, «Occurrence of 3-chloro-propane-1, 2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review», *Food Addit. Contam.*, vol. 19, n. August, pp. 619–631, 2002.
- [3] A. P. Ariseto, P. Francisca, e C. Marcolino, «Revisão», vol. 36, n. 9, pp. 1406–1415, 2013.
- [4] E. Panel e F. Chain, «Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol ( MCPD ), and their fatty acid esters , and glycidyl fatty acid esters in food EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain ( CONTAM )», vol. 14, n. March, 2016.
- [5] C. Of, P. For, T. H. E. Reduction, D. The, P. Of, e A. T. Contain, «DURING THE PRODUCTION OF ACID-HVPs AND PRODUCTS THAT CONTAIN ACID-HVPs», pp. 1–7, 2008.
- [6] B. Q. Lee e S. M. Khor, «3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in Soy Sauce: A Review on the Formation, Reduction, and Detection of This Potential Carcinogen», *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 14, n. 1, pp. 48–66, Jan. 2015.
- [7] C. Industry, «Background Paper ( for internal use only ) MCPD and Glycidyl Fatty Acid Esters , including Free MCPD and Glycidol , in Foods».
- [8] V. Ilko, Z. Zelinková, M. Doležal, e J. Velišek, «3-Chloropropane-1,2-Diol Fatty Acid Esters in Potato Products», *Czech J. Food Sci.*, vol. 29, n. 4, pp. 411–419, 2011.
- [9] R. A. Studies, «Fatty Acid Esters of in Food», n. 50, 2012.
- [10] Efsa, «Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1 , 2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment», *EFSA J.*, vol. 11, n. 9, pp. 1–45, 2013.
- [11] C. Crews, C. Hamlet, P. Sadd, D. Baxter, I. Slaiding, R. Muller, J. Velišek, W. Matthews, a Cockcroft, P. J. Gilbert, e J. Dennis, «THE ORIGIN AND FORMATION OF 3-MCPD IN FOODS AND FOOD INGREDIENTS . Report Number : Author : Date : Project Title : Sponsor : Paul Reece October 2005 The origin and formation of 3-MCPD in foods and food Food Standards Agency Aviation House 125 Kingsway Lon», 2005.
- [12] I. Baer e G. -Belgium, «Chloropropanols and their esters IRMM -Institute for Reference Materials and Measurements Joint Research Centre (JRC) – European Commission».
- [13] J. Velišek, P. Calta, C. Crews, S. Hasnip, e M. Doležal, «3-Chloropropane-1,2-diol in models simulating processed foods: precursors and agents causing its decomposition», *Czech J. Food Sci.*, vol. 21, n. 5, pp. 153–161, 2004.
- [14] «DISCUSSION PAPER ON ACID HVP CONTAINING PRODUCTS AND OTHER PRODUCTS», vol. 14, n. November 2005, 2006.
- [15] R. Series, *3-MCPD E sters in Food Products*. 2009.
- [16] «O que é o malte e quais os seus benefícios». [Em linha]. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/beneficios-do-malte/>.
- [17] F. Liu, «3-monochloro-1,2-propanediol», 2010.
- [18] N. J. Jędrkiewicz R, Kupka M, Głowacz A, Gromadzka J, «3-MCPD: A Worldwide Problem of Food Chemistry.», *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, n. April, 2015.

- [19] G. V Pace, «Migration Studies of Chloropropanols From Paperboard Packaging in Contact With Foodstuffs», n. January, 2011.
- [20] T. G. Hartman, «DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN IMPROVED METHOD FOR written under the direction of».
- [21] A. Dingel e A. Dingel, «Die indirekten Methoden im Überblick», 2013.
- [22] W. S. Cho, B. S. Han, K. T. Nam, K. Park, M. Choi, S. H. Kim, J. Jeong, e D. D. Jang, «Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol in Sprague-Dawley rats», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, n. 9, pp. 3172–3177, 2008.
- [23] L. Wen, J. Sun, S. Bai, Y. Hu, S. Wu, R. Jiao, S. Ou, e W. Bai, «Reproductive Effects of 3-Monochloropropane-1, 2-diol on Mice Sperm Function and Early Embryonic Development&lt;i>In Vitro&lt;/i>», *J. Food Nutr. Res.*, vol. 3, n. 6, pp. 405–409, 2015.
- [24] A. K. K. Rahn e V. A. Yaylayan, «What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation?», *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, n. 3, pp. 323–329, 2011.
- [25] T. Wenzl, V. Samaras, A. Giri, G. Buttinger, L. Karasek, e Z. Zelinkova, «Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD ( both in free and ester form ) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on com», 2015.
- [26] V. Oils, F. P. Implications, H. Health, e M. Esters, «FEDIOL Q & A on 2- and 3-MCPD and Their Esters and Glycidyl Esters», n. July, pp. 33–35, 2016.
- [27] R. A. Raznim, A. Kuntom, W. L. Siew, N. A. Ibrahim, M. R. Ramli, R. Hussein, e K. Nesaretnam, «Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils», *Food Control*, vol. 25, n. 1, pp. 355–360, 2012.
- [28] R. A. Raznim, A. Kuntom, W. L. Siew, N. A. Ibrahim, M. R. Ramli, R. Hussein, e K. Nesaretnam, «Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils», *Food Control*, vol. 25, n. 1, pp. 355–360, 2012.
- [29] J. Levin, G. Ng, D. Fortes, S. Garcia, S. Lacey, e D. Grubba, «Profitability and sustainability in palm oil production: analysis of incremental financial costs and benefits of RSPO compliance», *WWF, Washington, DC*, 2012.
- [30] H. Del e A. D. E. Palma, «Historia del aceite de palma», pp. 1–18.
- [31] D. O. Edem, «Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review», *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 57, n. 3/4, pp. 319–341, 2002.
- [32] «Should the US food industry be concerned about a 3-MCPD backlash?» [Em linha]. Disponível em: [http://www.mpoc.org.my/Should\\_the\\_US\\_food\\_industry\\_\\_be\\_concerned\\_about\\_a\\_3-MCPD\\_backlash%255E.aspx](http://www.mpoc.org.my/Should_the_US_food_industry__be_concerned_about_a_3-MCPD_backlash%255E.aspx).
- [33] C. Rspo, «Receitas de Amor Requisitos e Procedimento», 2016.
- [34] A. Starski, M. Jędra, H. Gawarska, e J. Postupolski, «Assessing exposure to 3-MCPD from bakery products based on monitoring studies undertaken throughout Poland», *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.*, vol. 64, n. 4, pp. 277–283, 2013.
- [35] C. Crews, a. Chiodini, M. Granvogl, C. Hamlet, K. Hrnčířík, J. Kuhlmann, a. Lampen, G. Scholz, R. Weisshaar, T. Wenzl, P. R. Jasti, e W. Seefelder, «Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives», *Food Addit. Contam.*



- Part A*, vol. 49, n. April 2016, pp. 1–35, 2012.
- [36] «Reports on tasks for scientific cooperation Collection and collation of data on levels of 3-monochloropropanediol (3-MCPD) and related substances in foodstuffs», 2004.
  - [37] E. Bash, «No Title No Title NBNBNB», *PhD Propos.*, vol. 1, pp. 1–18, 2015.
  - [38] F. Wöhrlin, H. Fry, e A. Preiß-Weigert, *Collaborative Study for the Determination of 3-MCPD-Fatty Acid Esters in Edible Fats and Oils*. 2011.
  - [39] V. Christova-Bagdassarian, J. A. Tishkova, e T. M. Vrabcheva, «3-Monochloro-1,2-propandiol (3-MCPD) in soy sauce from the Bulgarian market», *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, vol. 6, n. 3, pp. 163–167, 2013.
  - [40] C. G. Hamlet, L. Asuncion, J. Velíšek, M. Doležal, Z. Zelinková, C. Crews, W. Anderson, e C. Pye, «Investigation of the formation of 3-chloropropane-1,2-diol ( 3-MCPD ) from mono- and di-esters of its fatty acids in foods ( FS231006 , FS231074 , FS231075 )», n. February, pp. 1–99, 2014.
  - [41] J. F. Safety e S. Group, «Survey of 3-mcpd in foods».
  - [42] M. R. Ramli, W. L. Siew, N. A. Ibrahim, R. Hussein, A. Kuntom, R. A. A. Razak, e K. Nesaretnam, «Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining», *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 88, n. 11, pp. 1839–1844, 2011.
  - [43] FEDIOL, «MCPD Esters and Glycidyl Esters. Review of mitigation measures Revision 2015.», n. 15SAF108, pp. 1–17, 2015.
  - [44] M. Contaminants, «INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials: Editorial», *Inf. - Int. News Fats, Oils Relat. Mater.*, vol. 13, n. 10, p. 762, 2002.
  - [45] F. Science, «Toolbox for the Mitigation of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Food».
  - [46] «IFST Information Statement: 3-MCPD and Glycidyl esters | IFST». [Em linha]. Disponível em: <http://www.ifst.org/knowledge-centre/information-statements/3-mcpd-and-glycidyl-esters>.
  - [47] G. Jd e I. Drugs, «Appendix A A», pp. 37–41, 2005.
  - [48] «Application of Modern Technology in Food Safety : Chloropropanols in Sauces and Condiments Dr. CHUNG Wai-cheung Food and Environmental Hygiene Department».
  - [49] Food Standards Australia New Zealand, «Chloropropanols in Food: An Analysis of Public Health Risk», n. 15, 2003.
  - [50] N. Francis e G. Myles, «Food and Agricultural Import Regulations and Standards Contaminated Oriental-Style Soy and Oyster Sauces», pp. 1–4, 1999.
  - [51] B. Q. Lee, C. W. J. B. Wan Mohamed Radzi, e S. M. Khor, «A simultaneous derivatization of 3-monochloropropanediol and 1,3-dichloropropane with hexamethyldisilazane-trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate at room temperature for efficient analysis of food sample analysis», *J. Chromatogr. A*, vol. 1432, n. January 2015, pp. 101–110, 2016.
  - [52] P. González, I. Racamonde, A. M. Carro, R. A. Lorenzo, e U. de S. de Compostela, «Combined Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Used For Determination of Chloropropanols in Water.pdf».
  - [53] U. Se, «GENERAL PRINCIPLES OF FOOD HYGIENE», pp. 1–31, 2003.
  - [54] «Certificação BRC/IFS». [Em linha]. Disponível em: <http://www.bureauveritas.pt/services+sheet/certificacao-brcifs>. [Acedido: 21-Fev-2017].
  - [55] «GC-MS Analytical Testing Lab Services | Gas Chromatography | EAG Labs». [Em linha].

Disponível em: <http://www.eag.com/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/>. [Acedido: 06-Mar-2017].

- [56] K. Sellers e R. Corporation, «Why Derivatize? Improve GC Separations with Contact your Restek», pp. 2–3, 2010.
- [57] K. Hrnčirik, Z. Zelinkova, e A. Ermacora, «Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters», *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, n. 3, pp. 361–367, 2011.
- [58] G. Für e D. I. E. Analytik, «Ergänzende Hinweise zu den DGF - Einheitsmethoden C - VI 17 ( 10 ) und C - VI 18 ( 10 ) zur Bestimmung der 3 - MCPD - und Glycidyl - Ester», pp. 1–3, 2012.

## ANEXOS

---

### A. Receitas Ensaios Piloto

A1) *Luxury* de Limão

Por motivos de confidencialidade, este anexo foi ocultado.

A2) *Luxury* Cacau

Por motivos de confidencialidade, este anexo foi ocultado.

A3) *Luxury* Mármore

Por motivos de confidencialidade, este anexo foi ocultado.

A4) *Luxury* Stracciatella

Por motivos de confidencialidade, este anexo foi ocultado.

## B. Cromatogramas

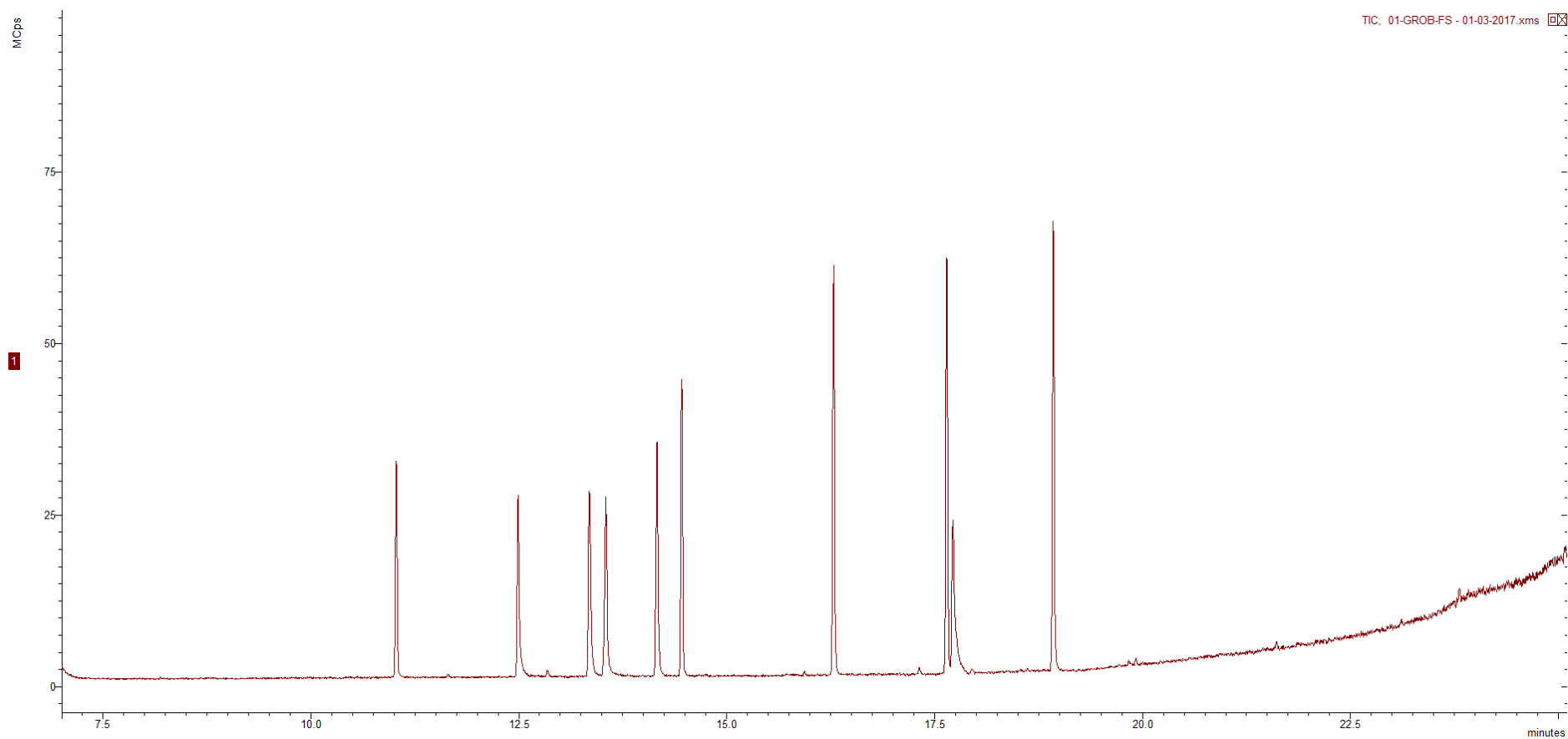


Figura B 1-Solução padrão de mistura de Grob da coluna de GC

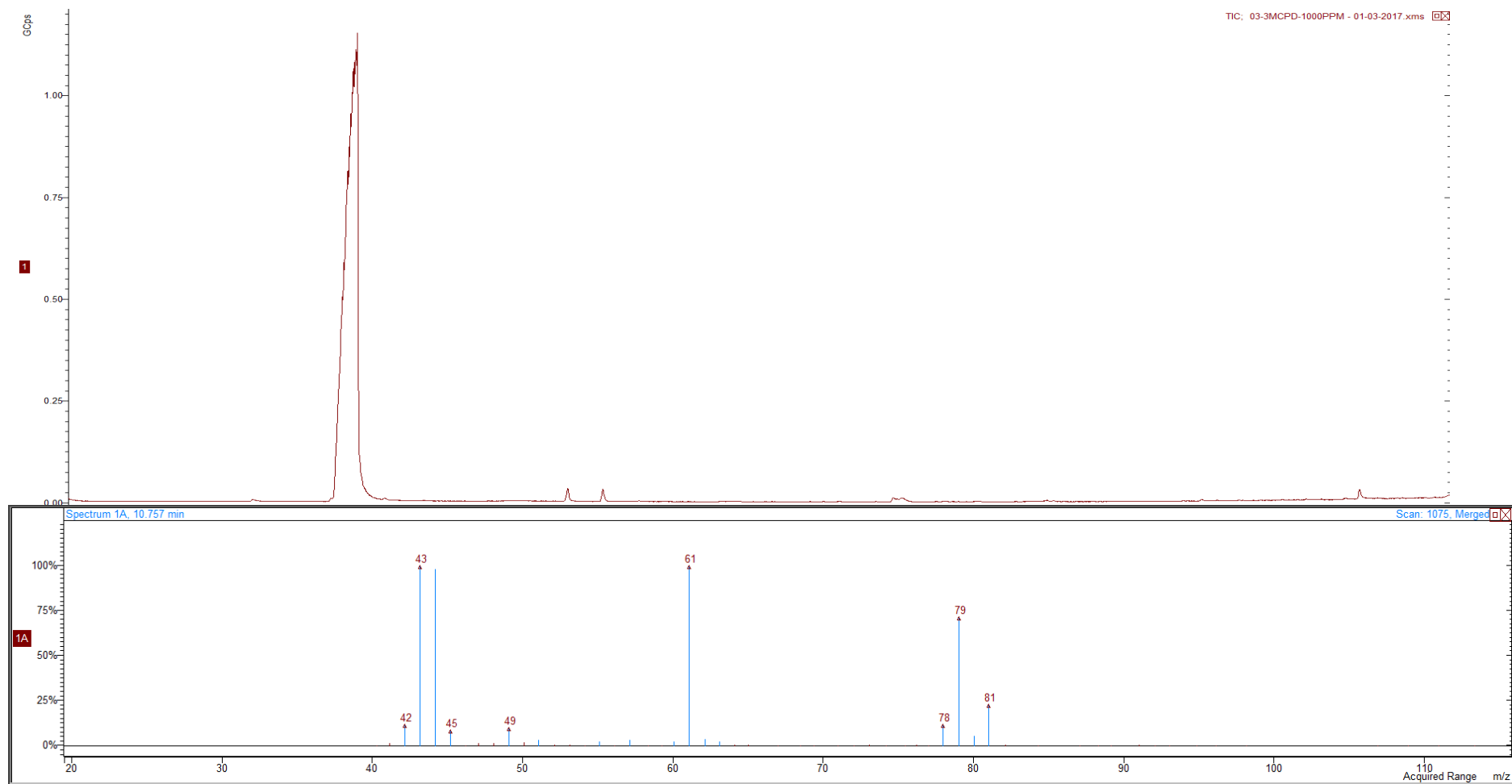
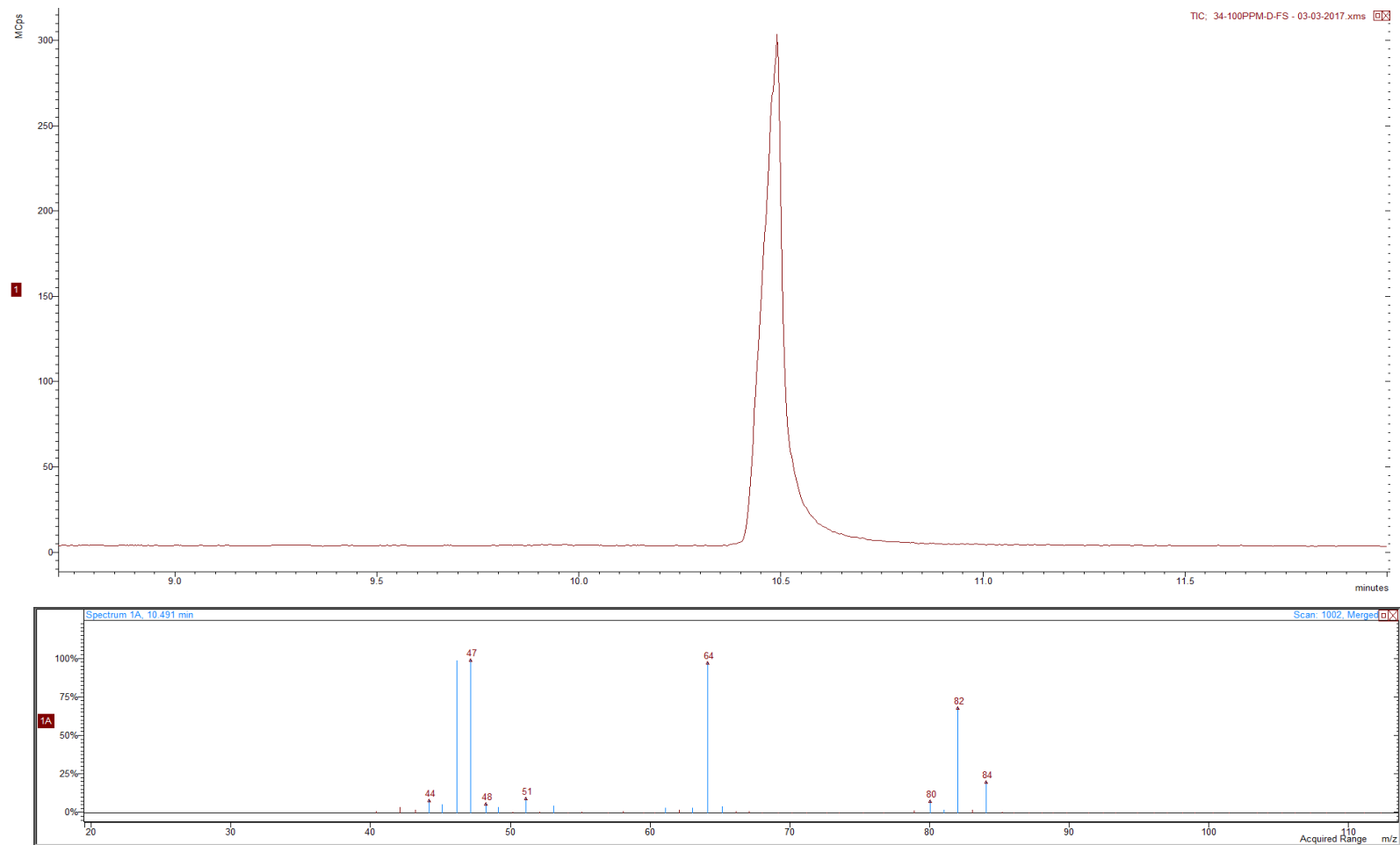
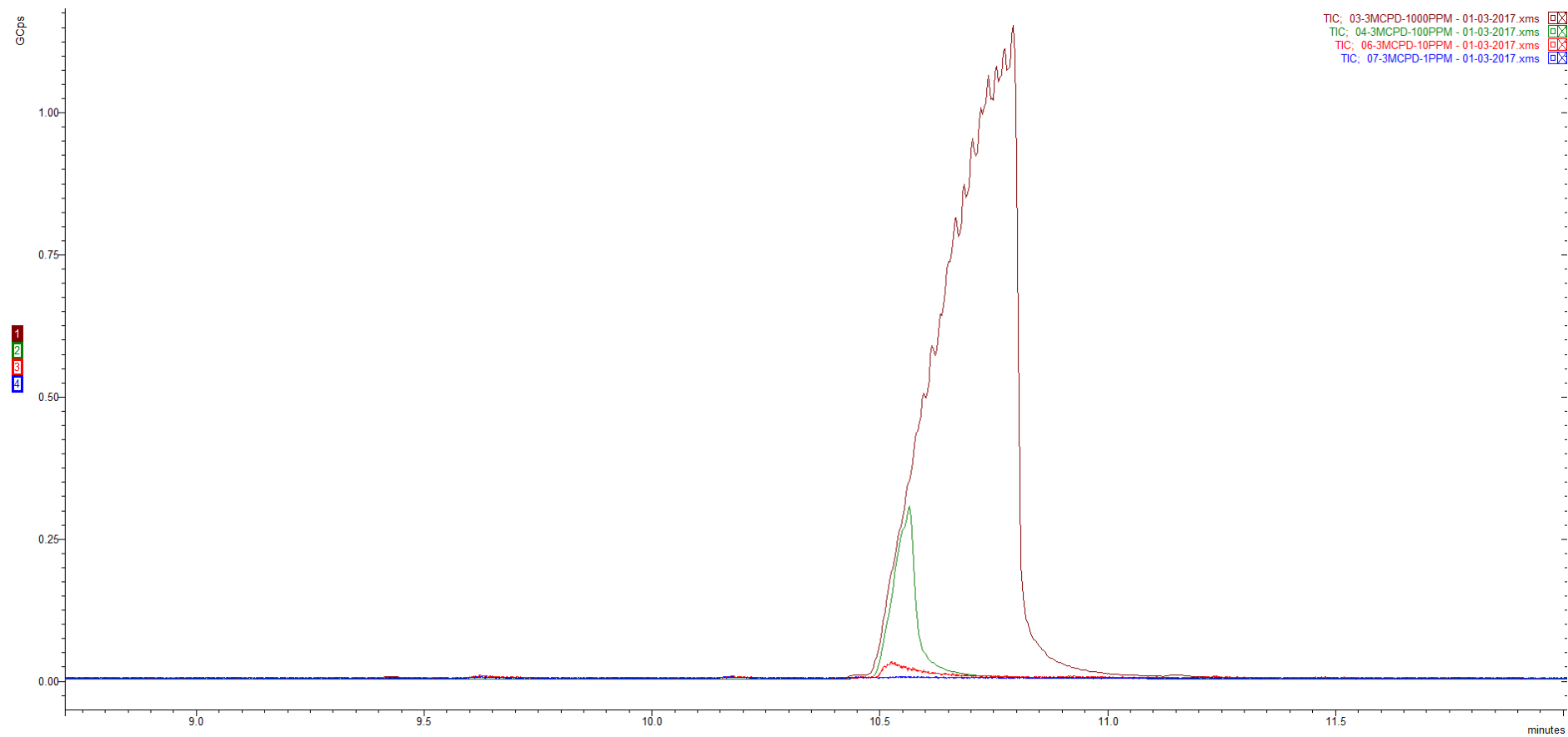


Figura B 2- Cromatograma e espectro de massa da solução mãe de 3-MCPD (1000 ppm) com TR= 14,18 s

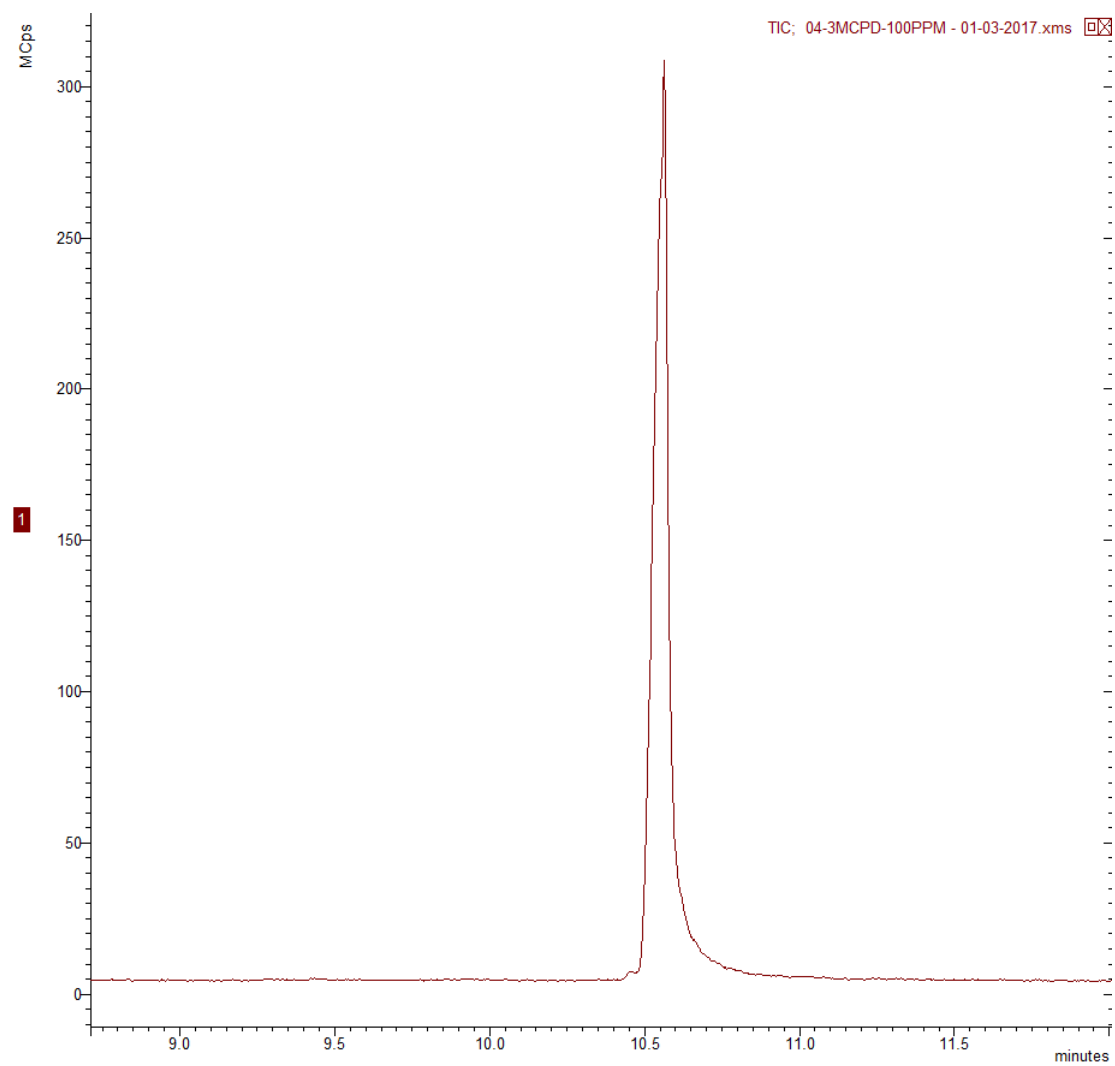




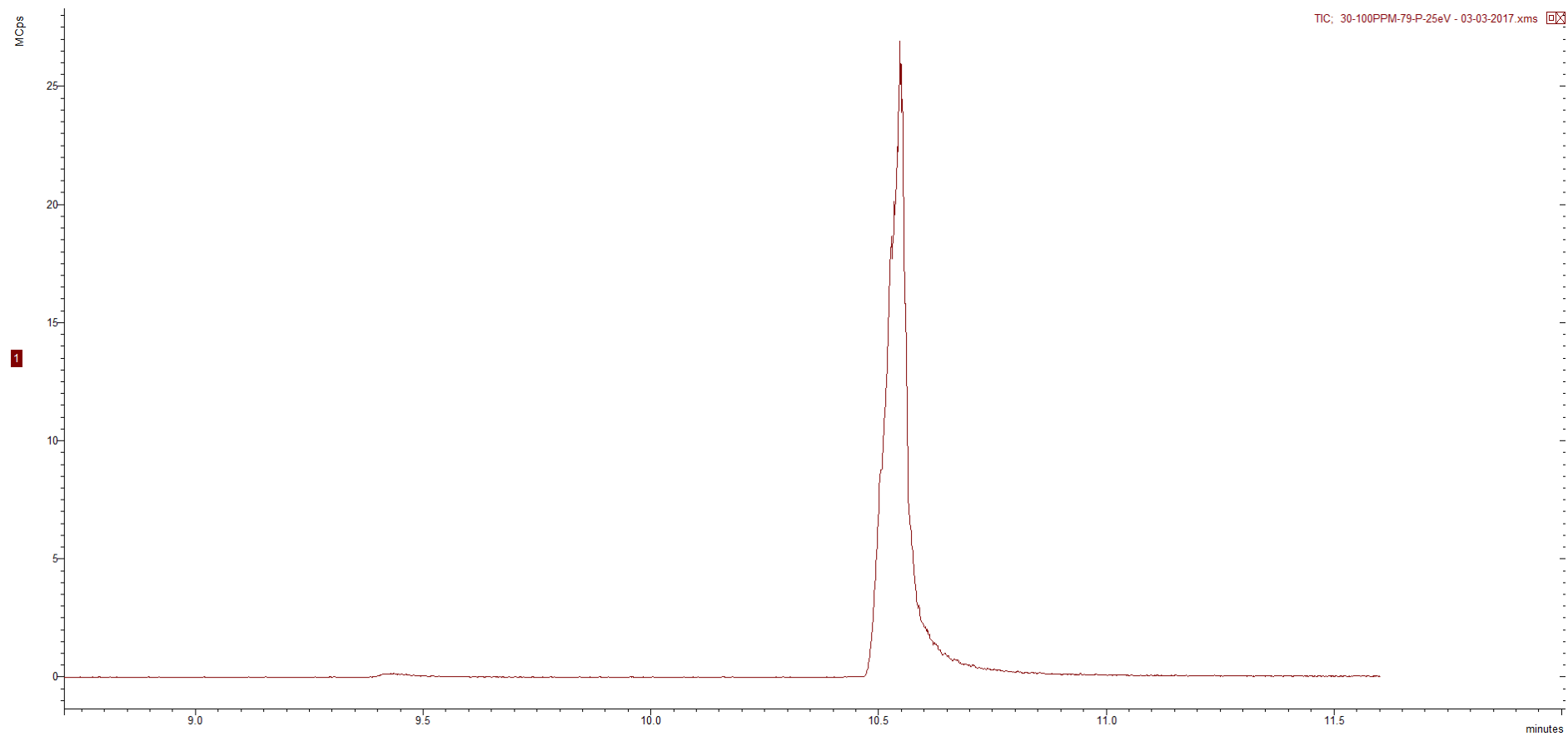
**Figura B 3- Cromatograma e espectro de massa do padrão deuterado de 3-MCPD**



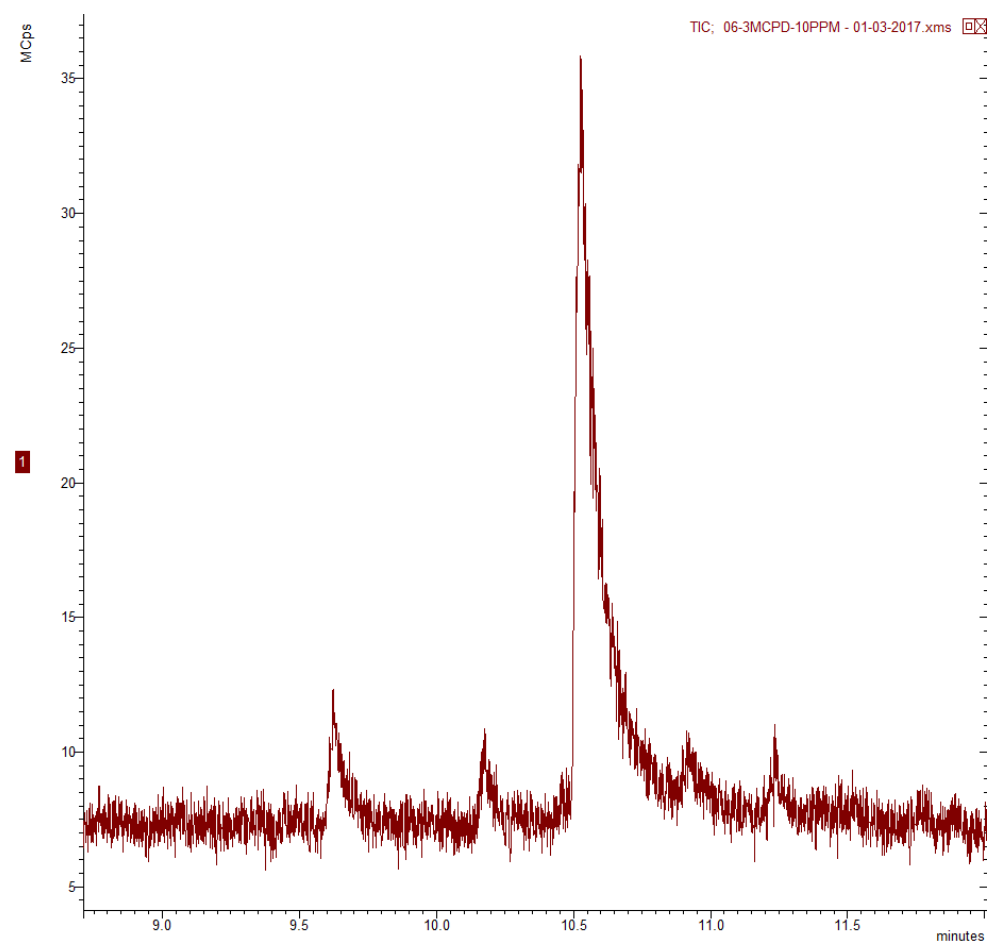
**Figura B 4- Subreposição de TIC da variação concentração do padrão 3-MCPD**



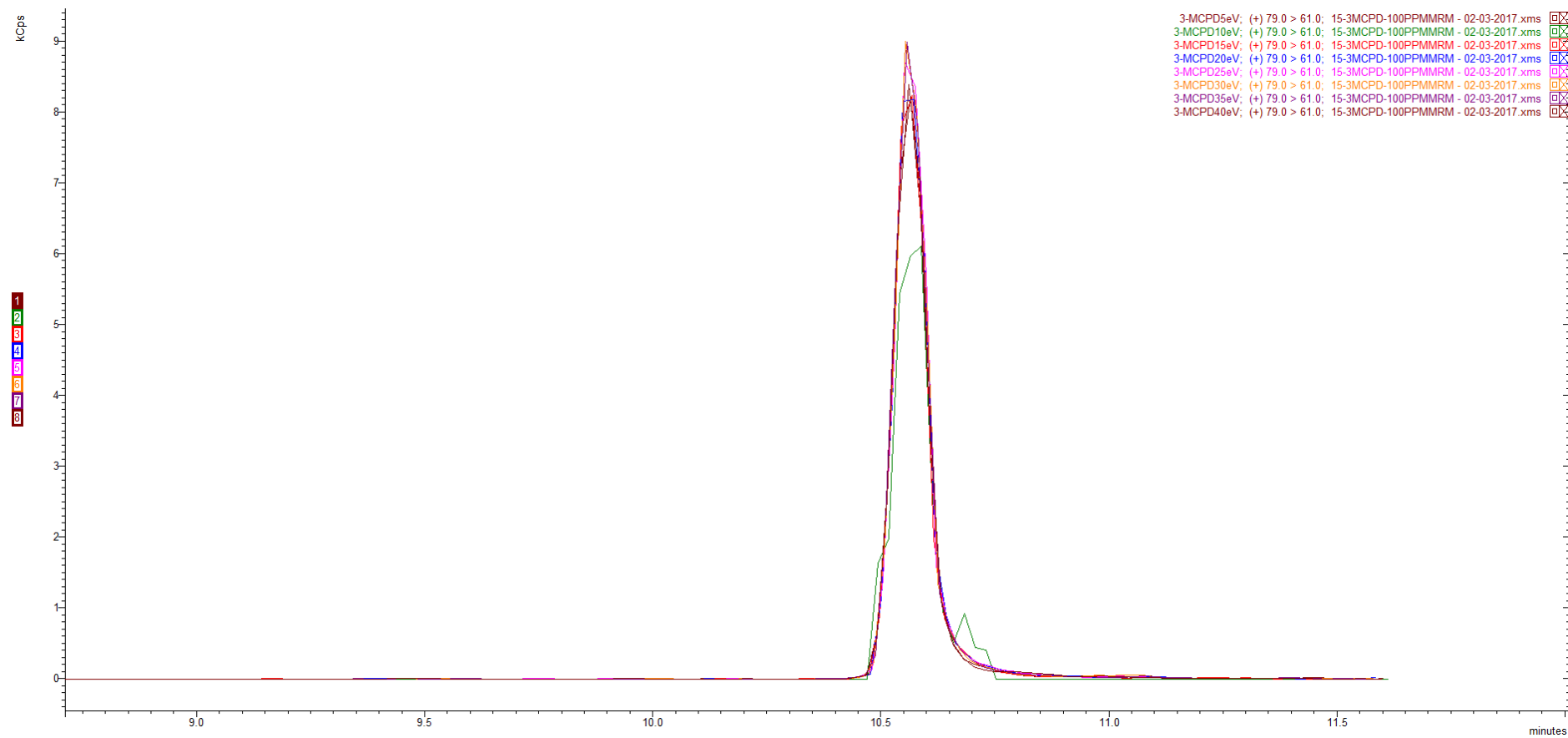
**Figura B 5- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 100 ppm**



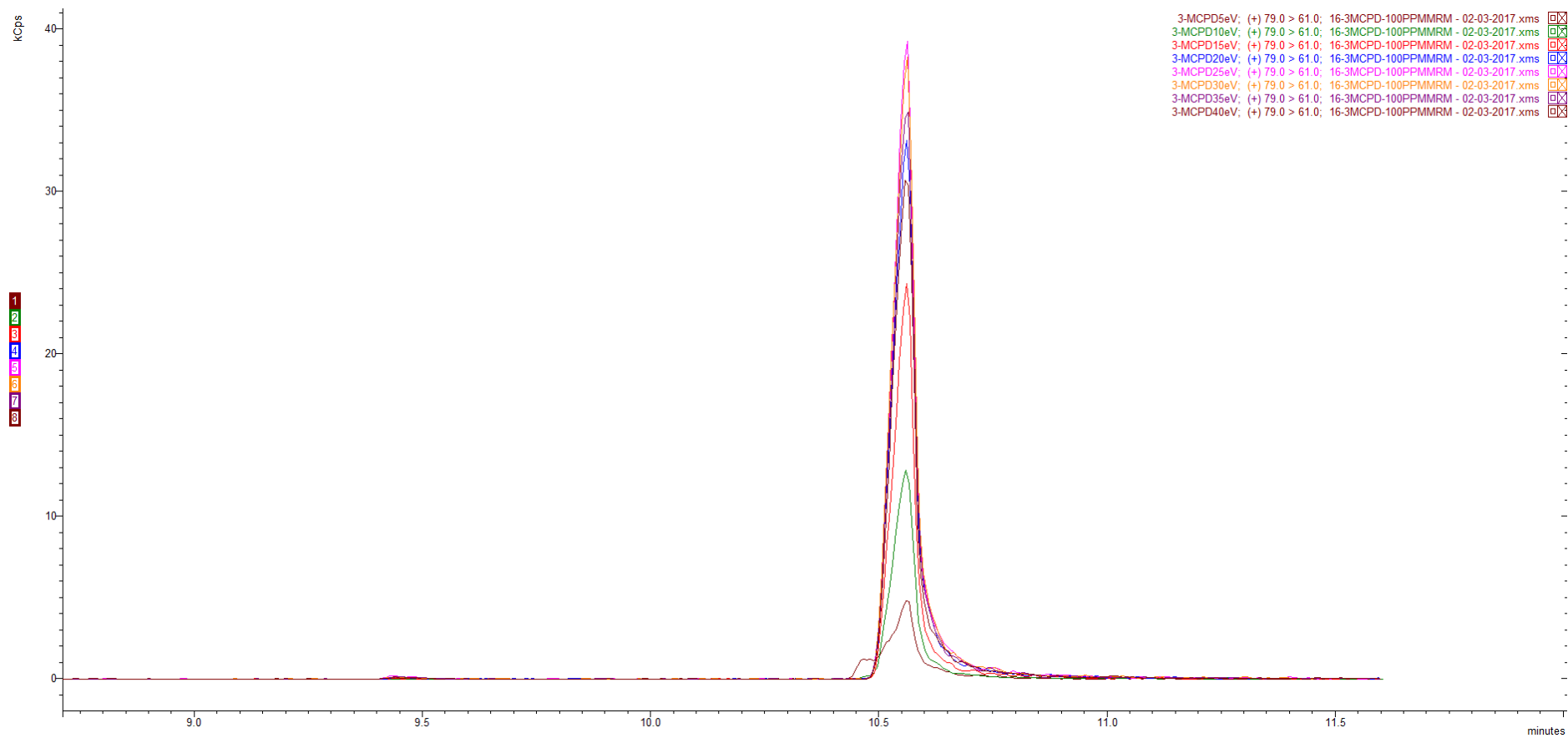
**Figura B 6- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 100 ppm com uma energia de 25 eV**



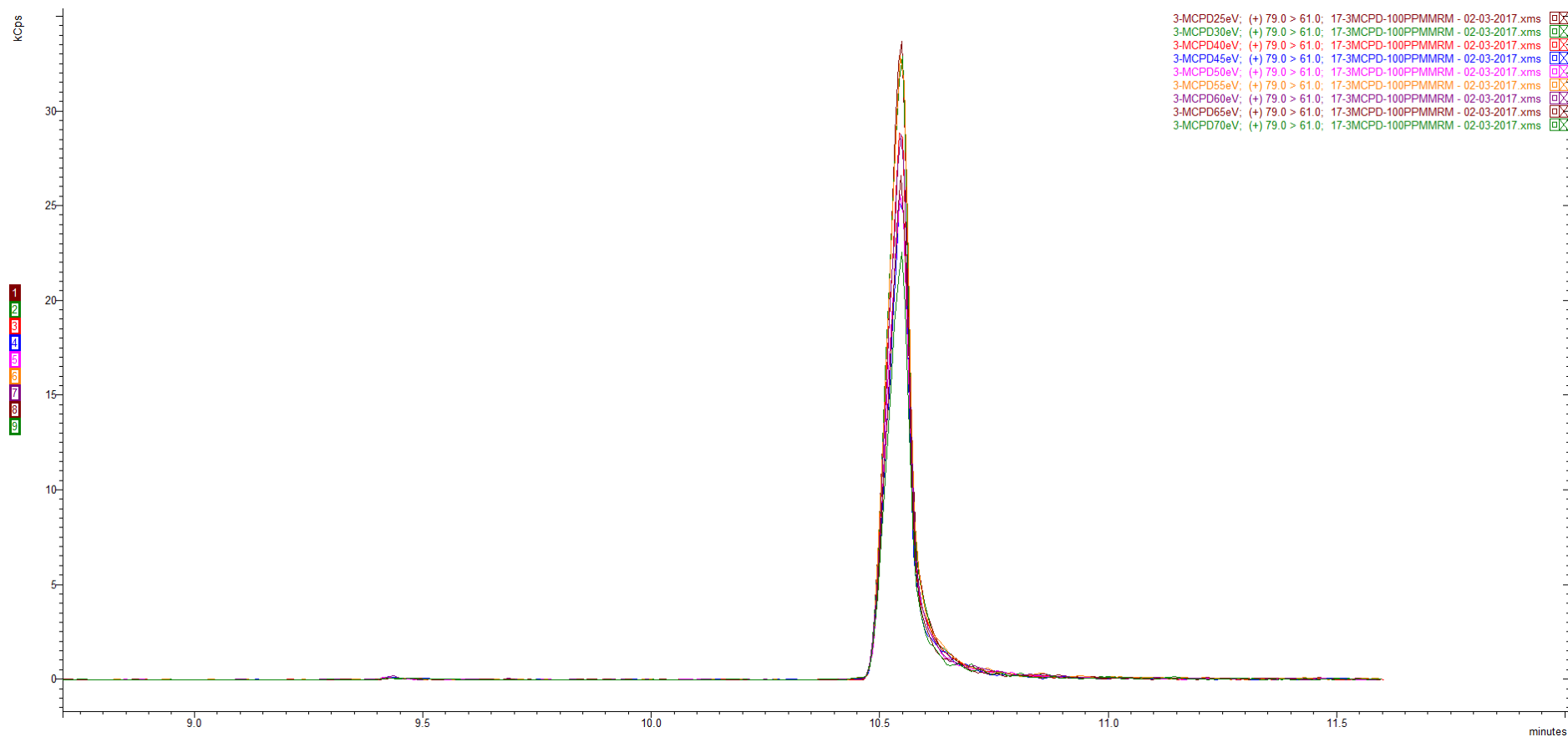
**Figura B 7- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm**



**Figura B 8- MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do íon 79 para o 61**

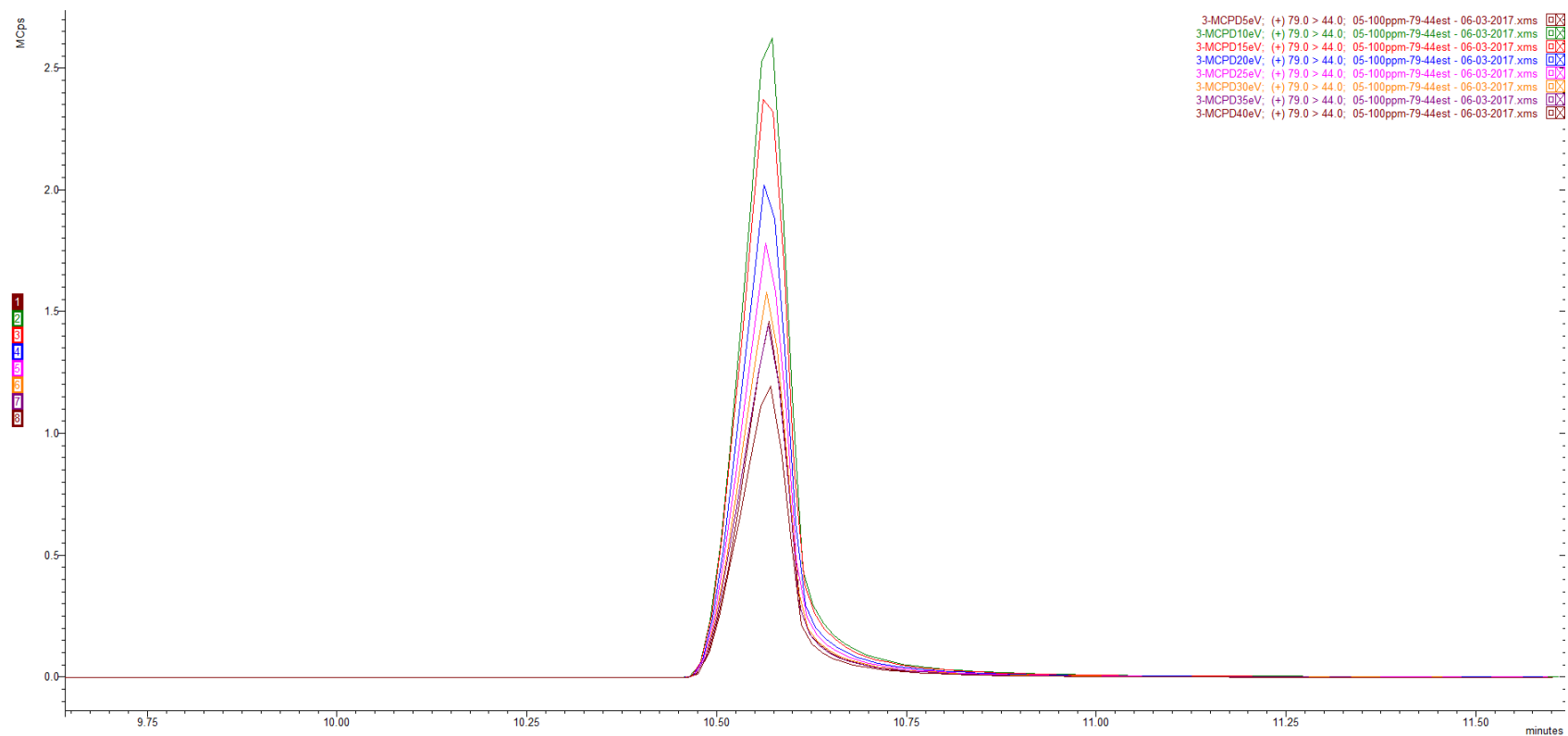


**Figura B 9- Sobreposição dos Cromatogramas de MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do íon 79 para o 61**

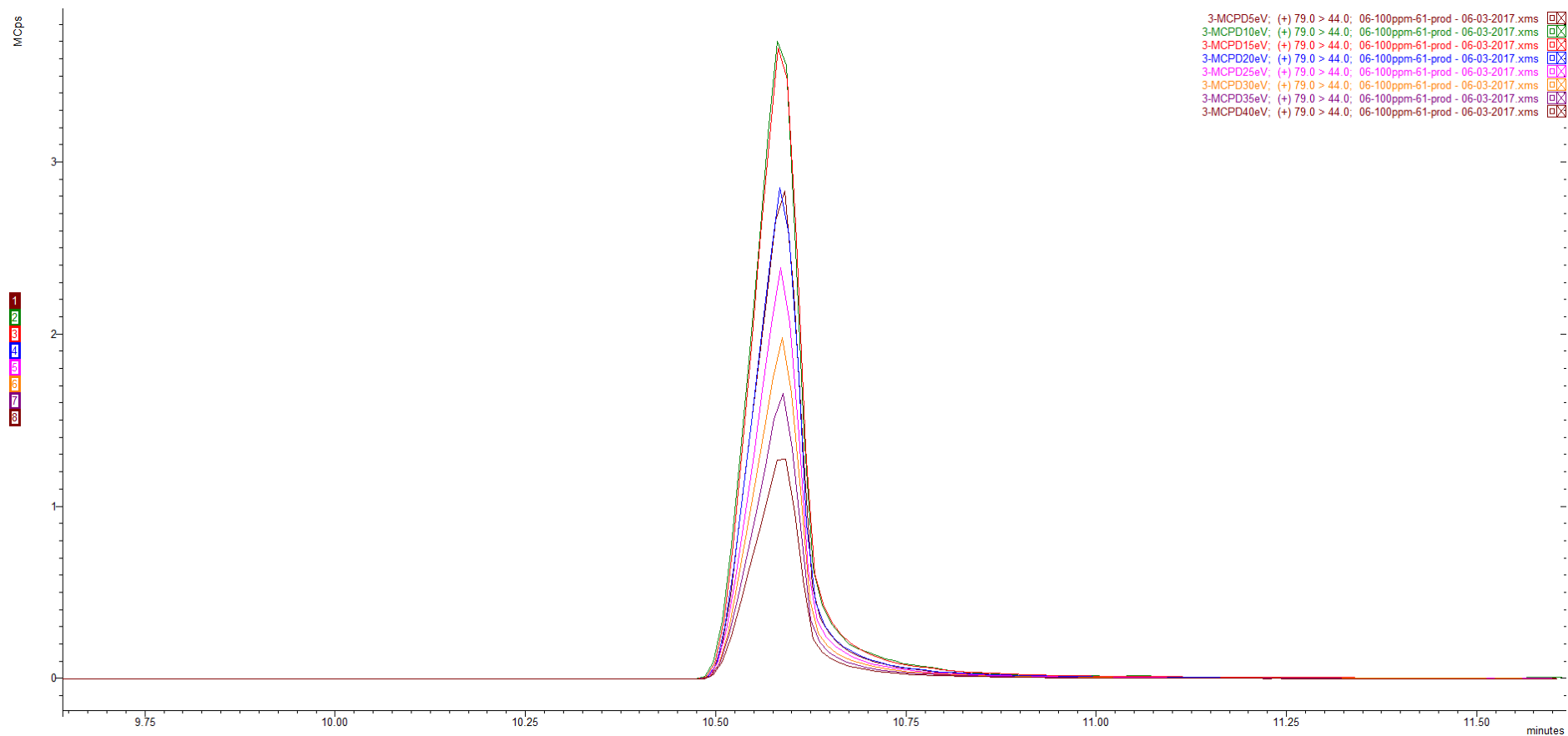


**Figura B 10- Sobreposição dos cromatogramas MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do íon 79 para o 61**

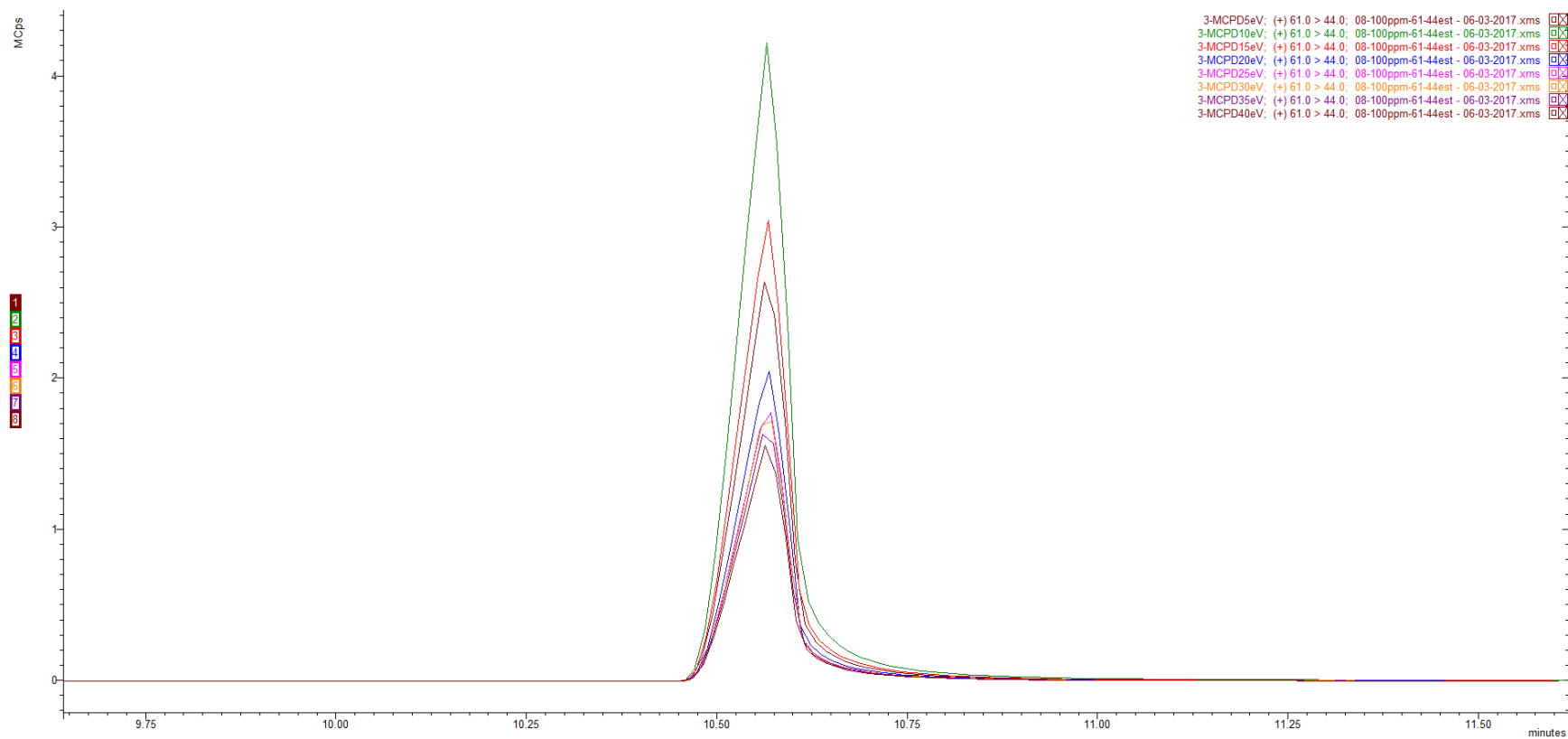




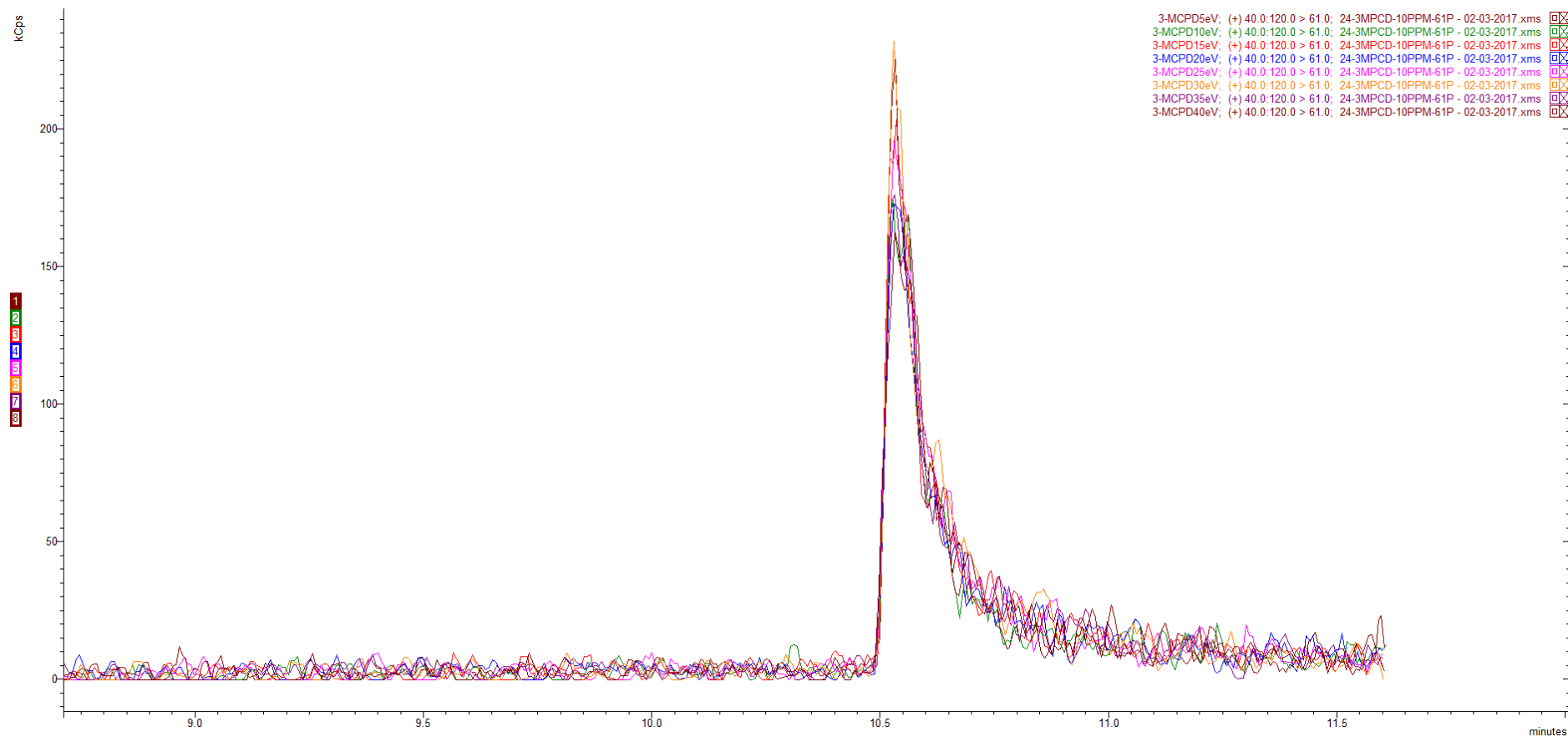
**Figura B 11- Sobreposição dos cromatogramas do MRM a 100 ppm da Solução Padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do íon 79 para o 44**



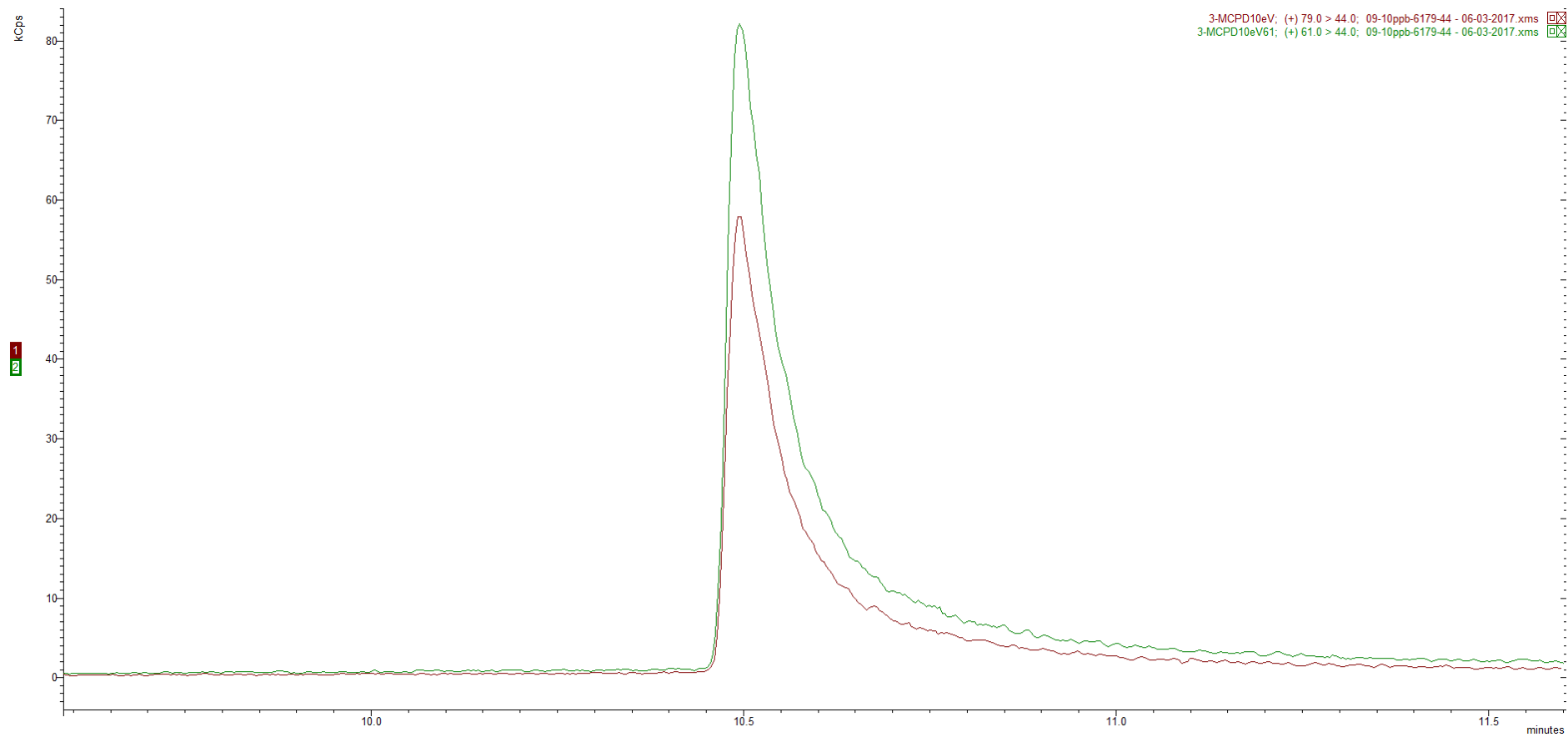
**Figura B 12- Sobreposição do cromatograma MRM a 100 ppm da solução padrão de 3-MCPD para diferentes energias de ionização da fragmentação do íon 79 para o 44 partindo do 61**



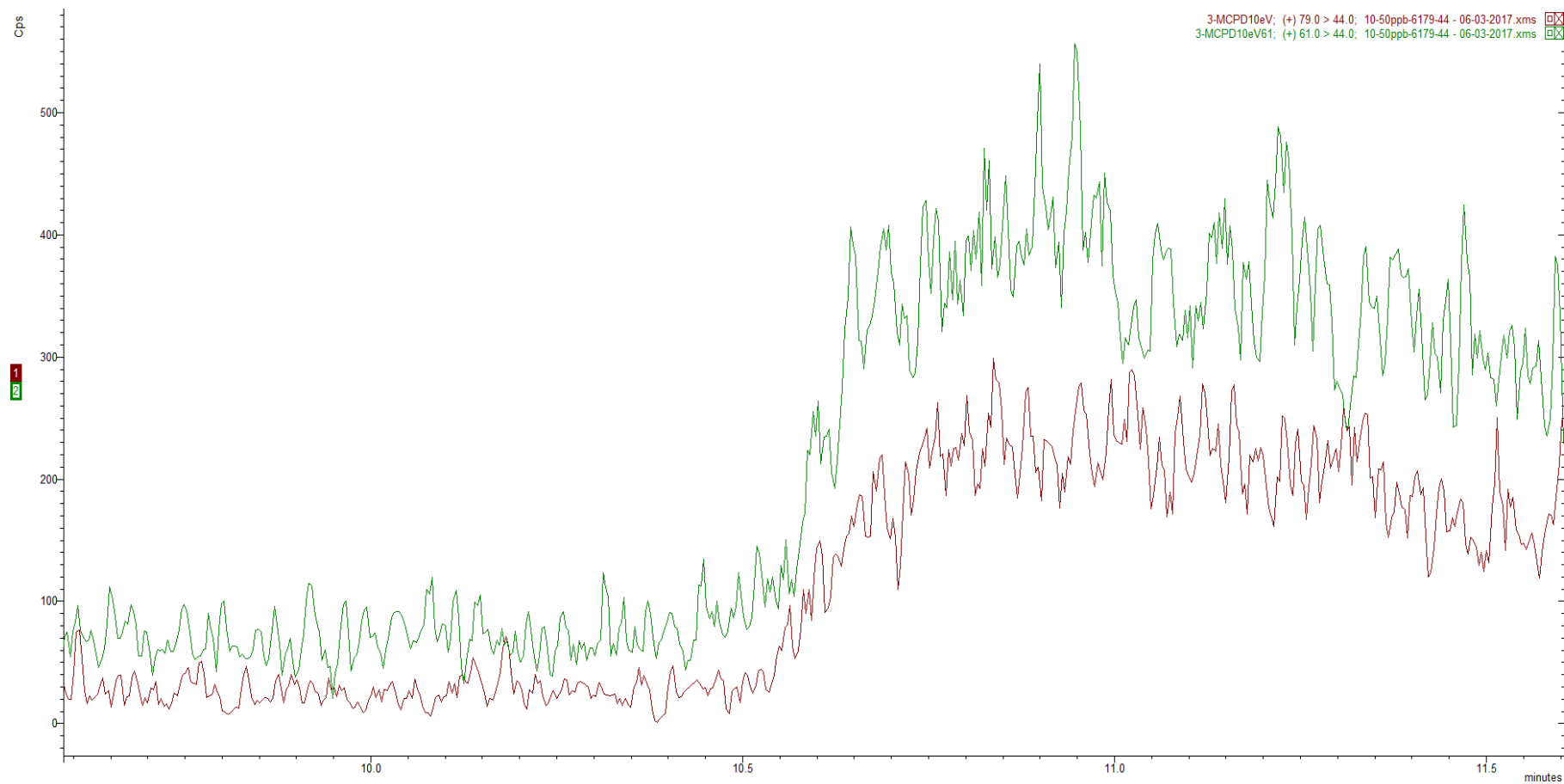
**Figura B 13- Sobreposição do cromatograma MRM da concentração a 100 ppm da solução Padrão de 3-MCPD da fragmentação do íon 61 para o 44**



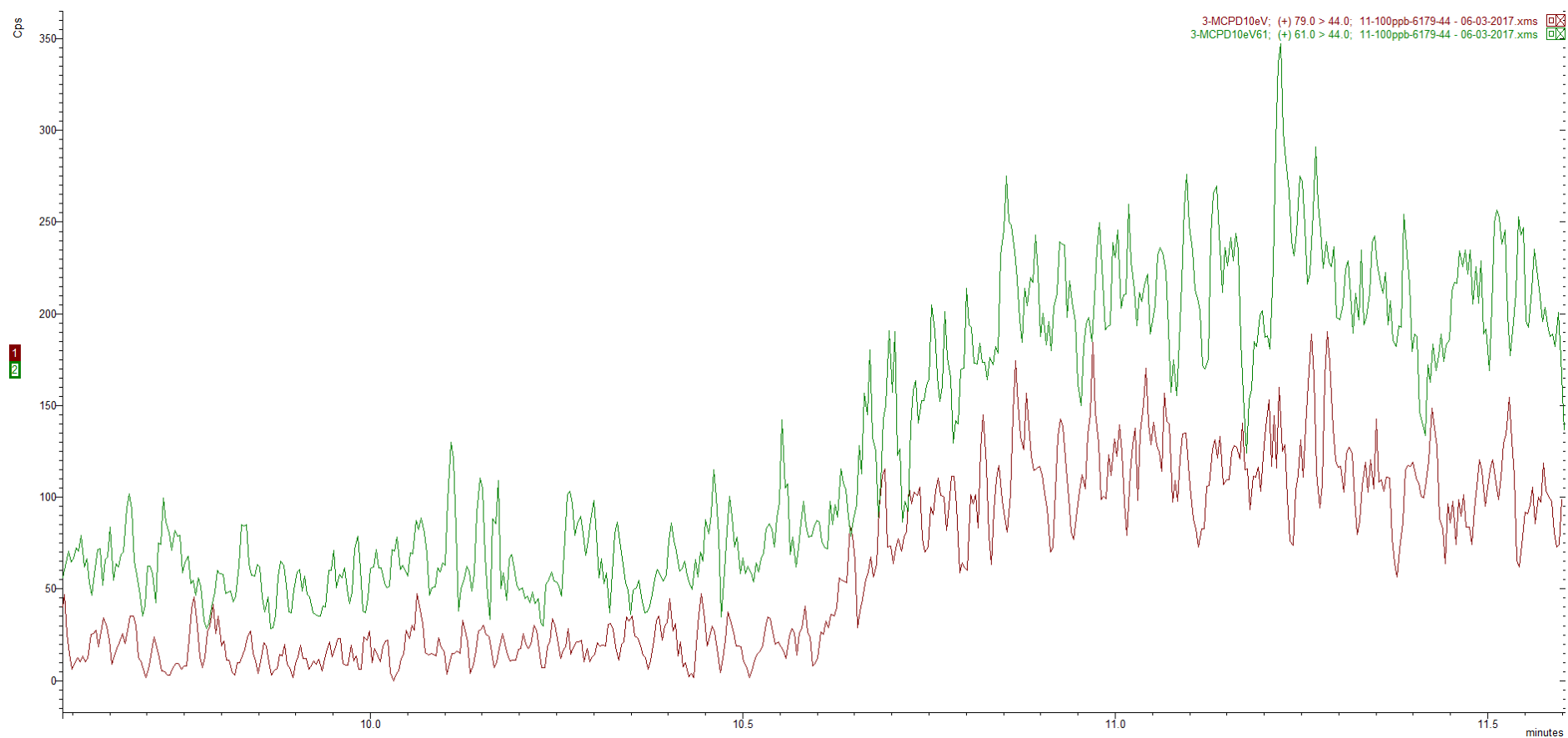
**Figura B 14- Sobreposição do cromatograma MRM do ião 40 para o 120 a resultar no 61 para uma de solução padrão a 10 ppm**



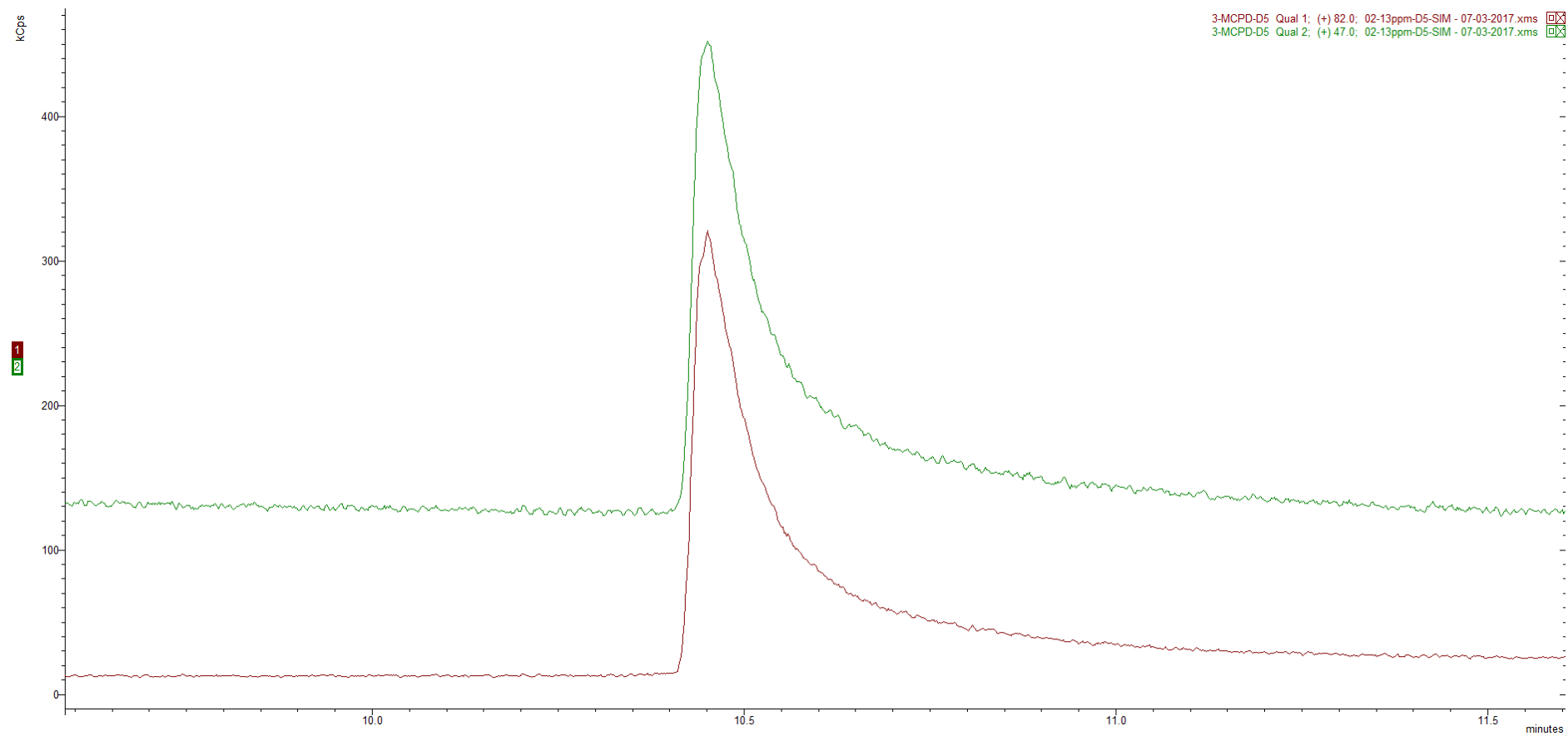
**Figura B 15- Sobreposição da mesma energia de fragmentação necessária para diferentes fragmentações**



**Figura B 16- Sobreposição de diferentes fragmentações, com a mesma energia de fragmentação para a solução 3-MCPD padrão a 50 ppb**



**Figura B 17- Sobreposição de diferentes fragmentações, com a mesma energia de fragmentação para a solução de 3-MCPD padrão a 100 ppb**



**Figura B 18- Cromatograma da sobreposição em modo SIM do padrão deuterado de 3-MCPD a 13 ppm**



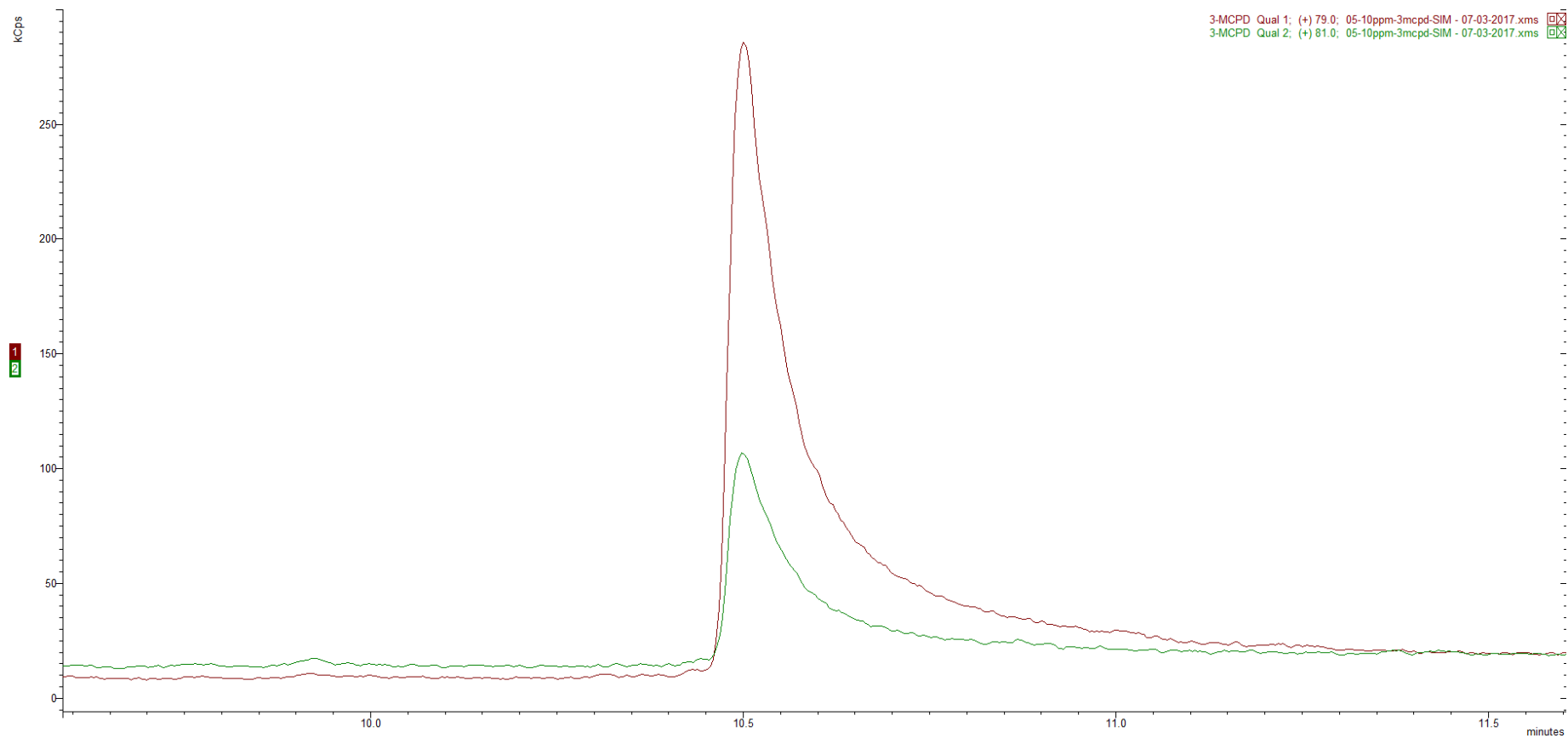
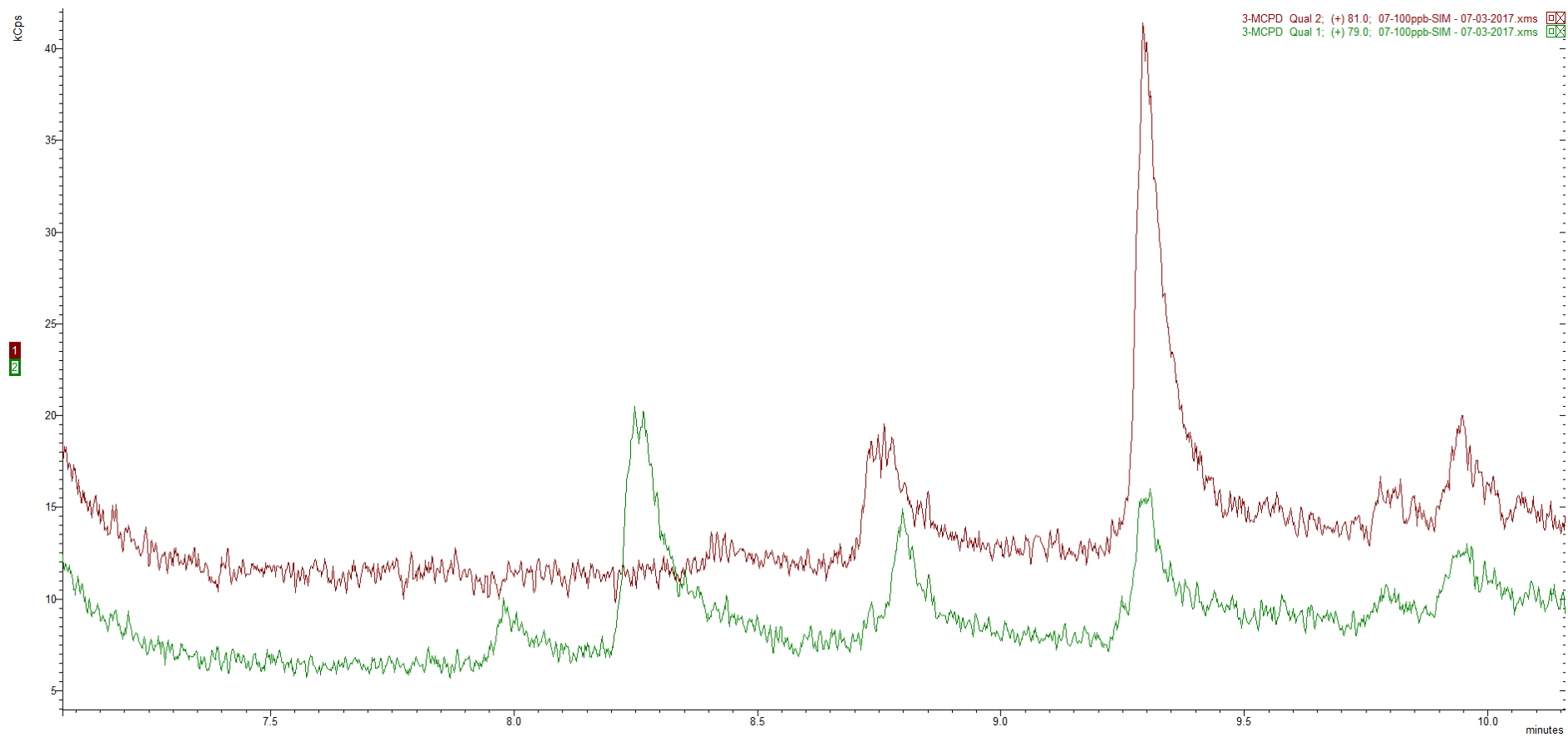


Figura B 19- Cromatograma da sobreposição em modo SIM da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm



**Figura B 20- Cromatograma da sobreposição em modo SIM da solução padrão de 3-MCPD a 100 ppb**

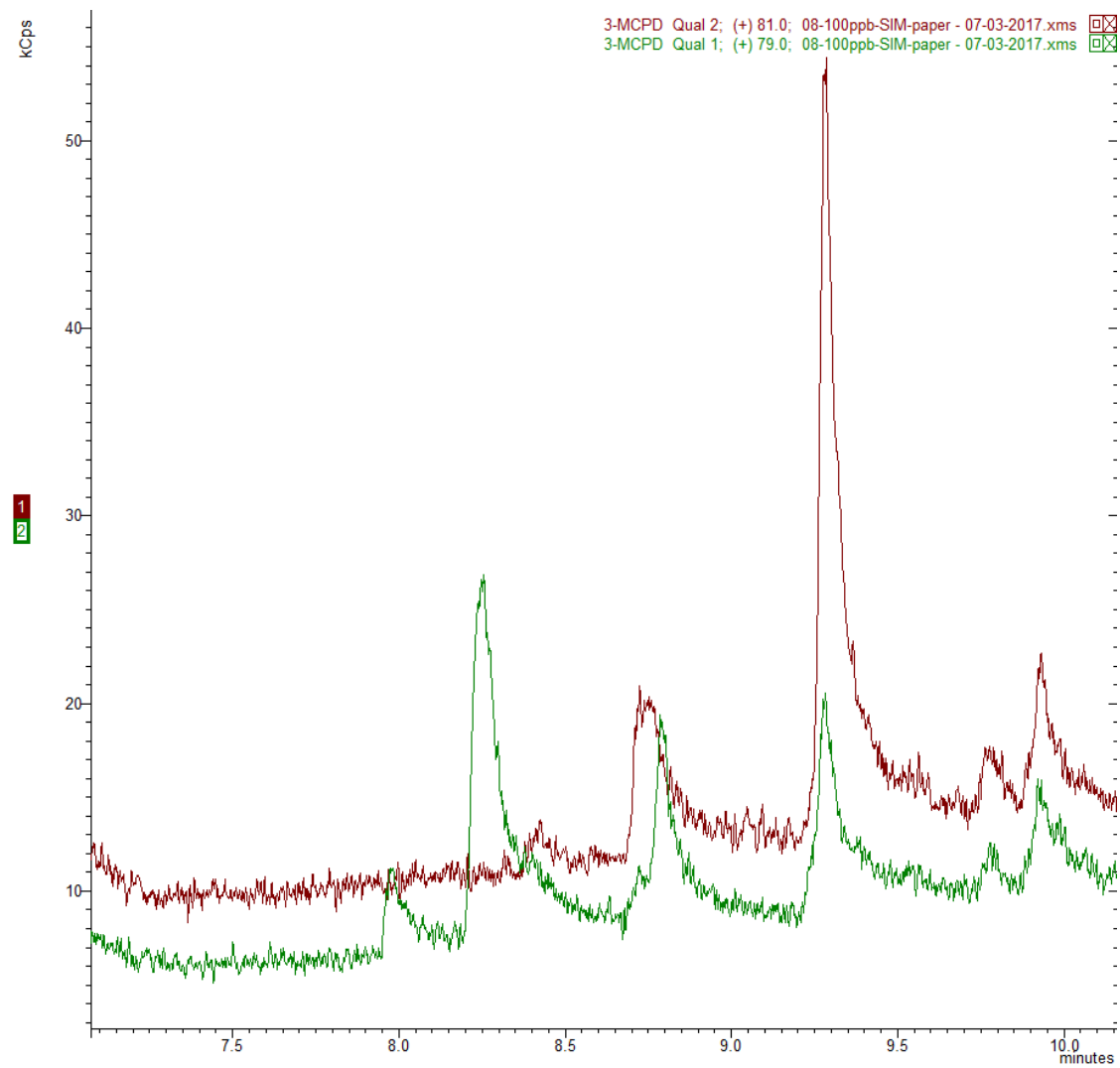
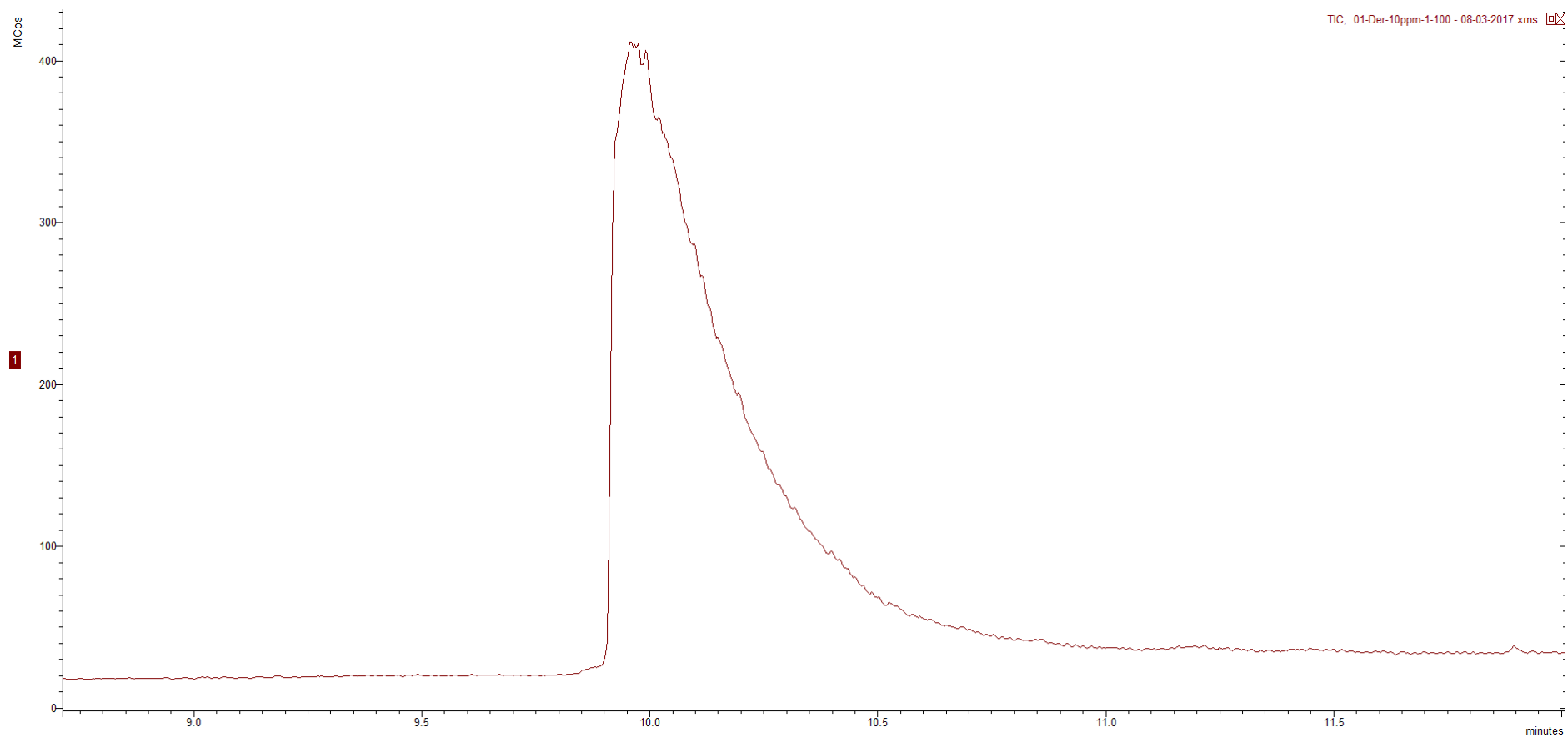
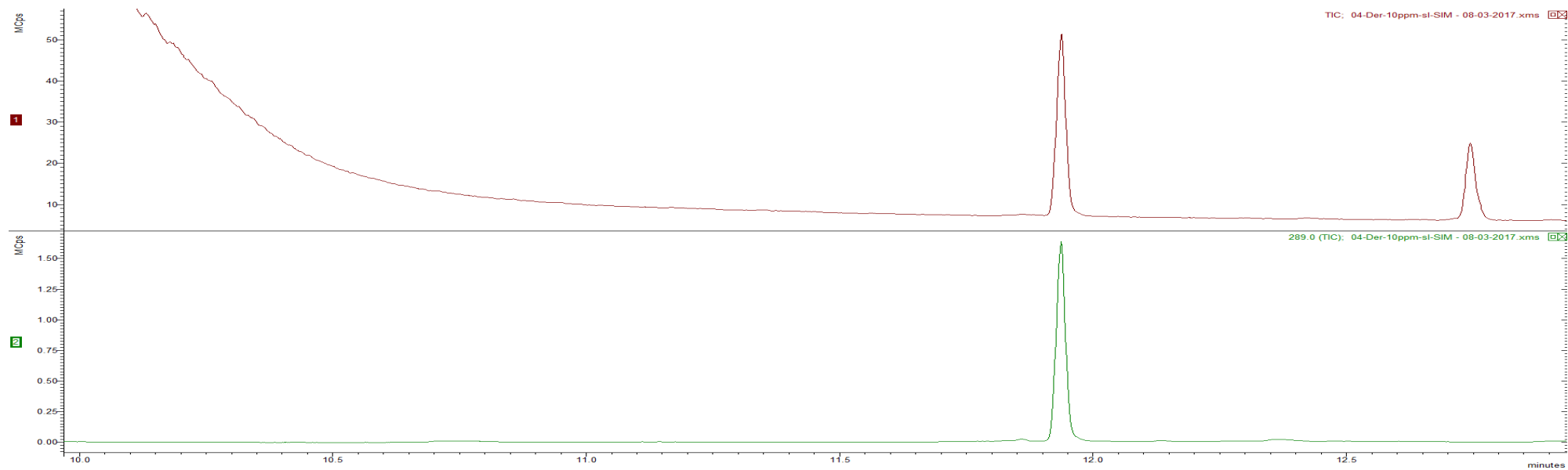


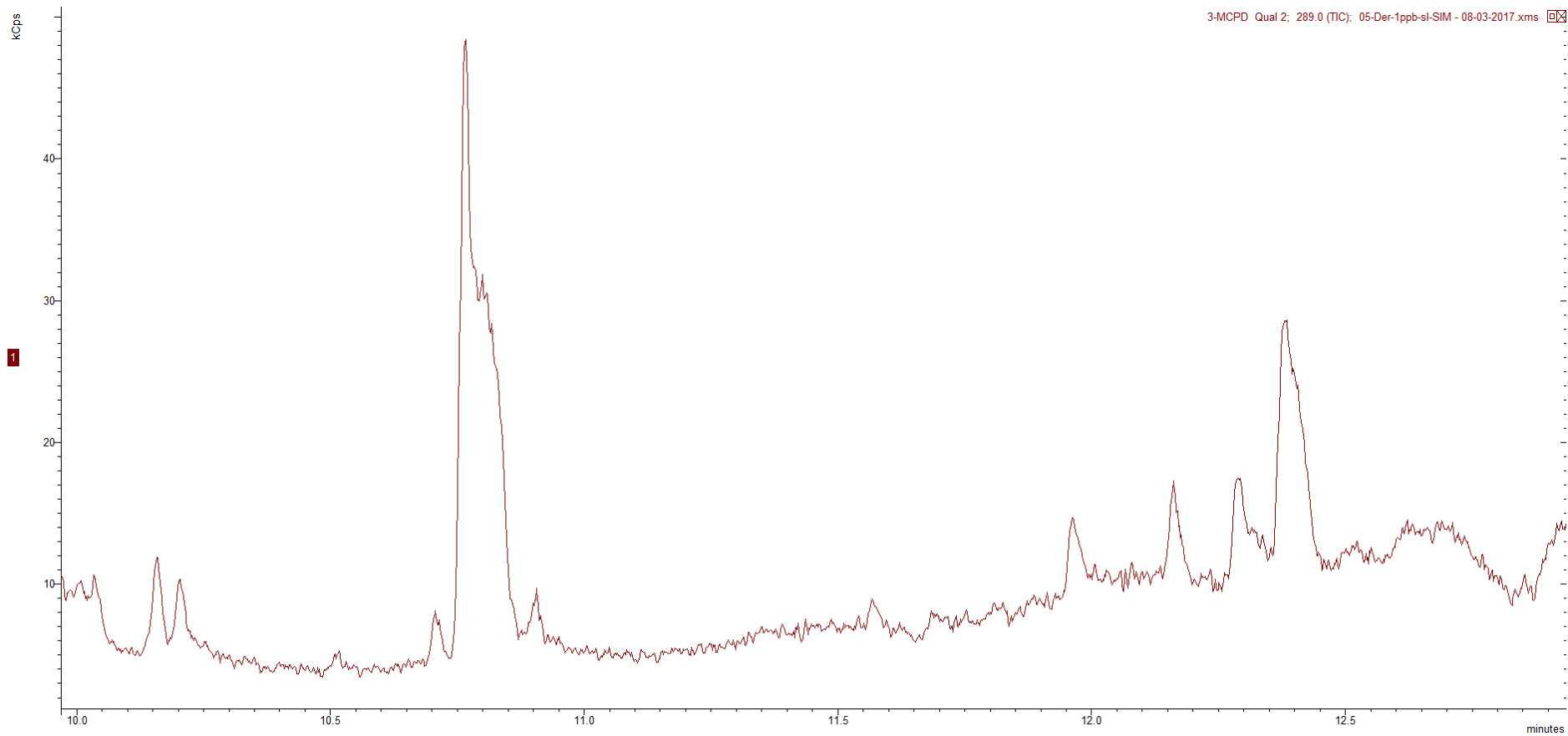
Figura B 21- Cromatograma da sobreposição do modo SIM comparativo de dois fragmentos a 100 ppb



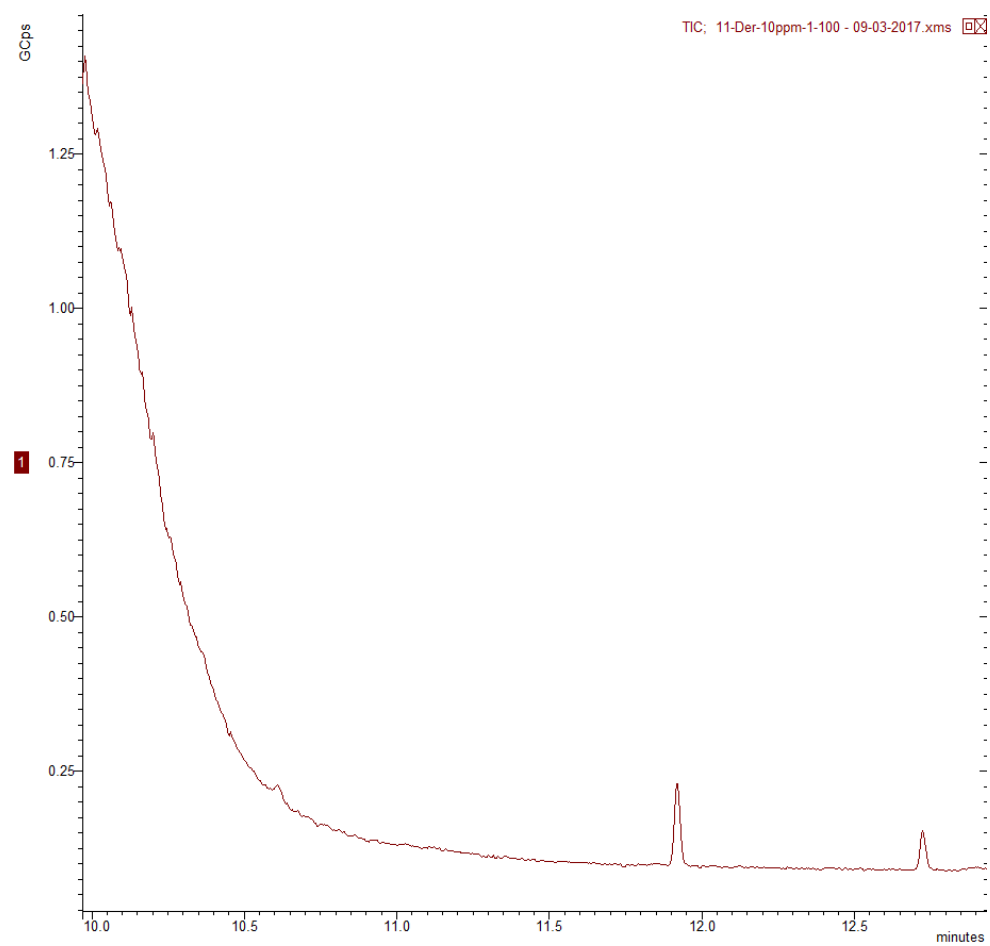
**Figura B 22- TIC a 10 ppm da solução padrão de 3-MCPD derivatizada com HFBA**



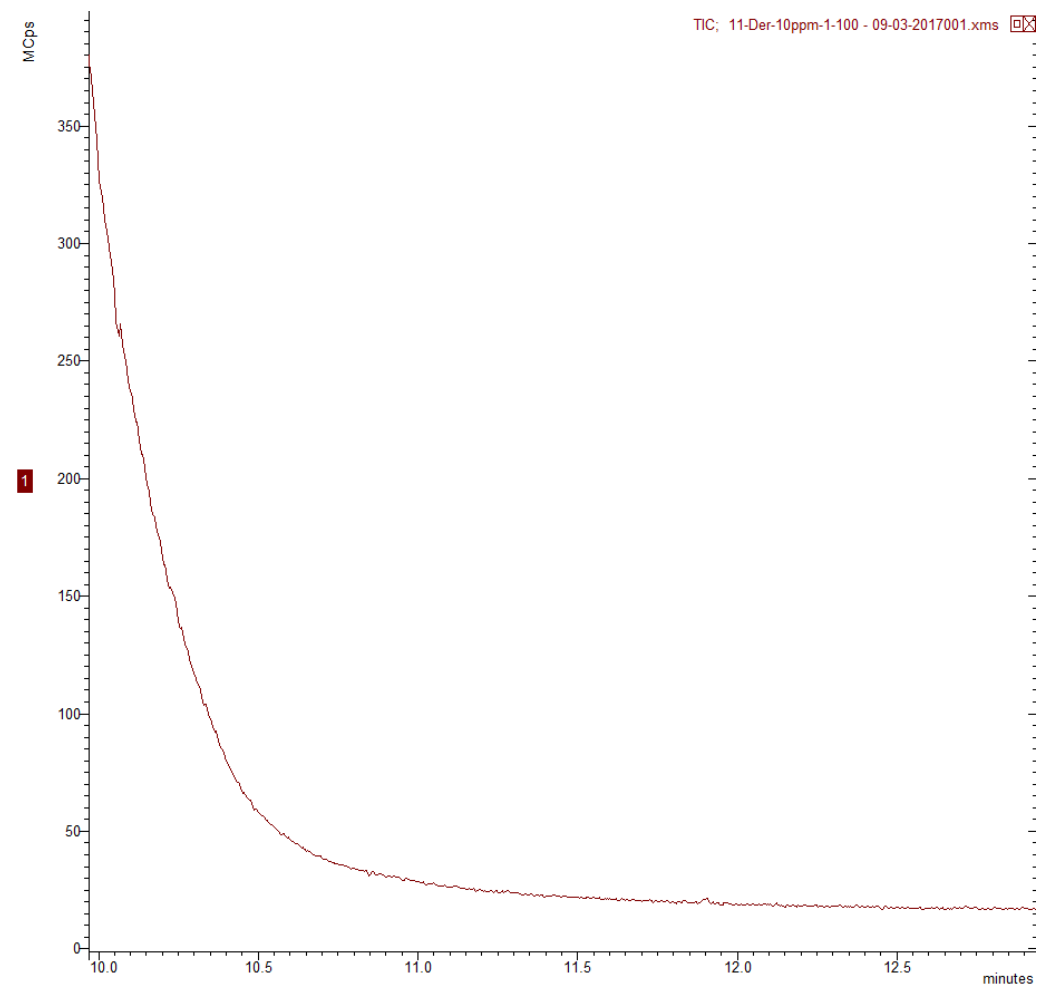
**Figura B 23- TIC modo XIM da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm derivatizada com HFBA**



**Figura B 24- TIC modo SIM solução padrão 3-MCPD de 1 ppb derivatizada com HFBA referente ao íon *qualifier* 289**

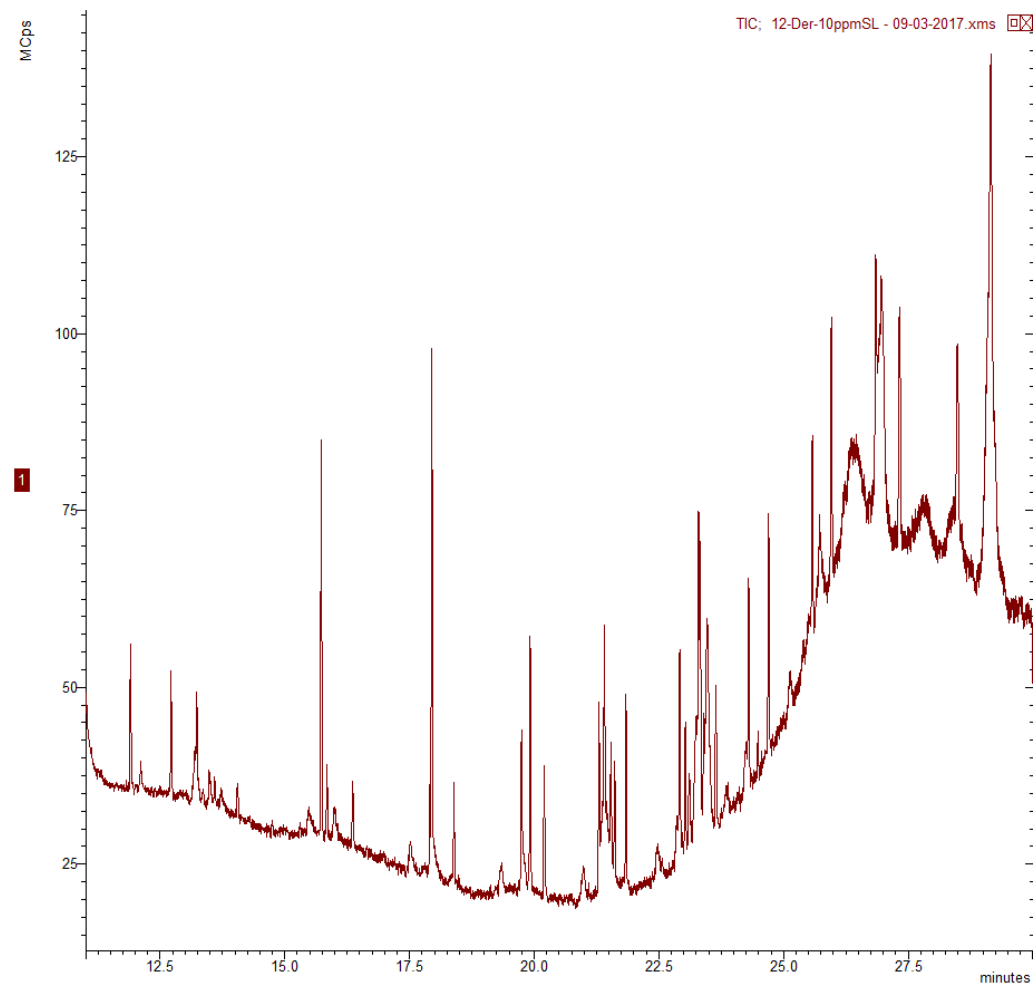


**Figura B 25- TIC da solução padrão de 3-MCPD a 10 ppm derivatizada com HFBA**

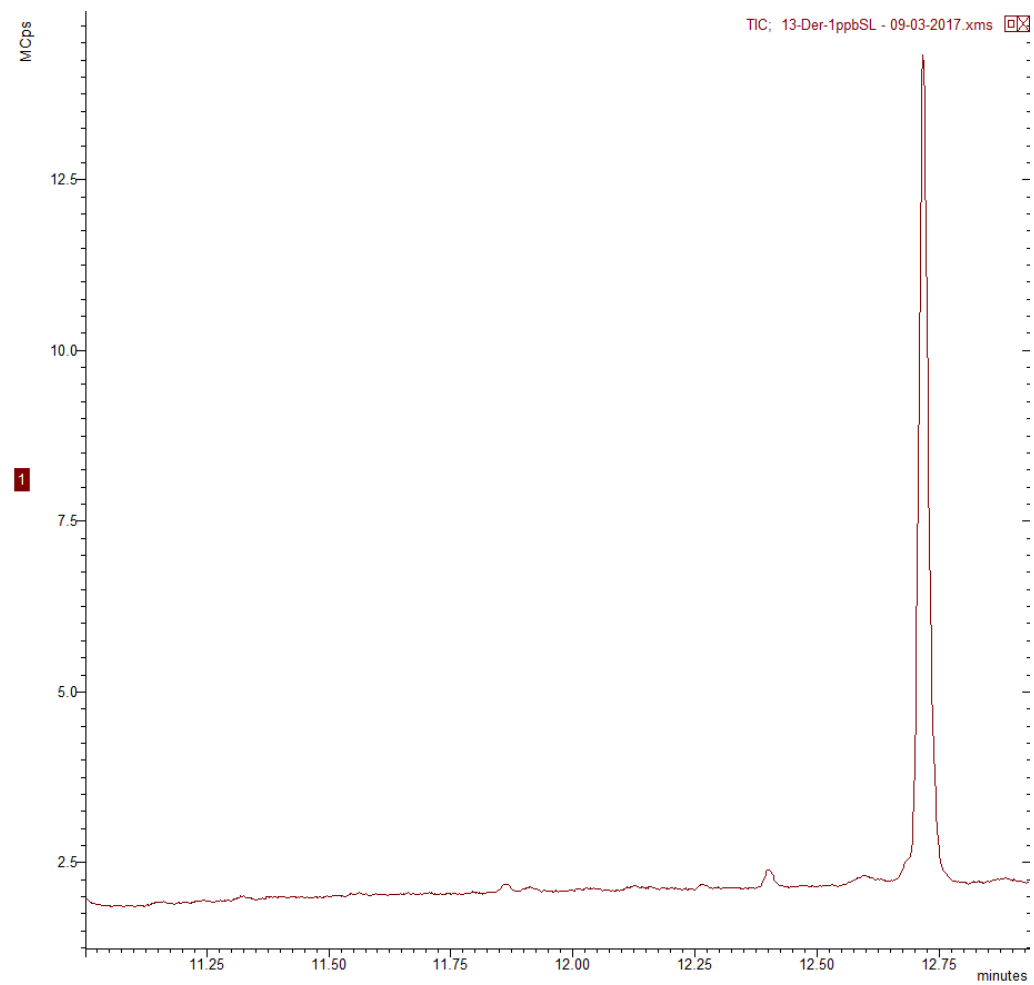


**Figura B 26- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD de 10 ppm derivatizada com HFBA**

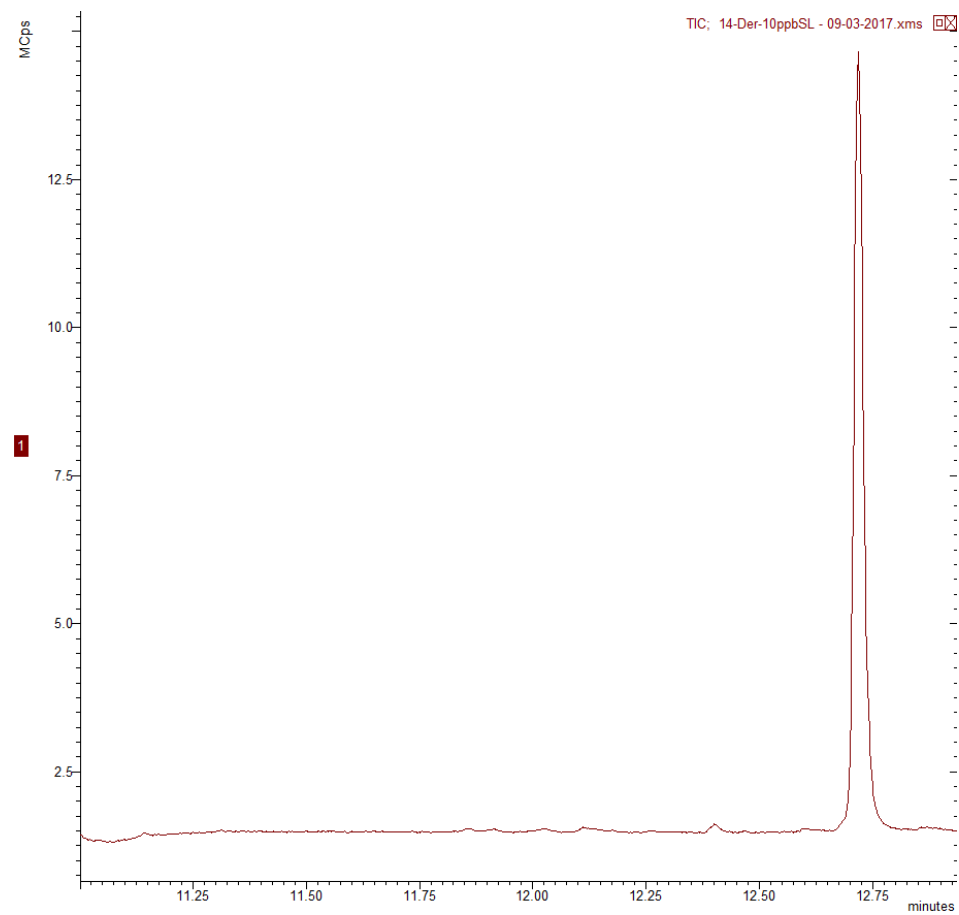




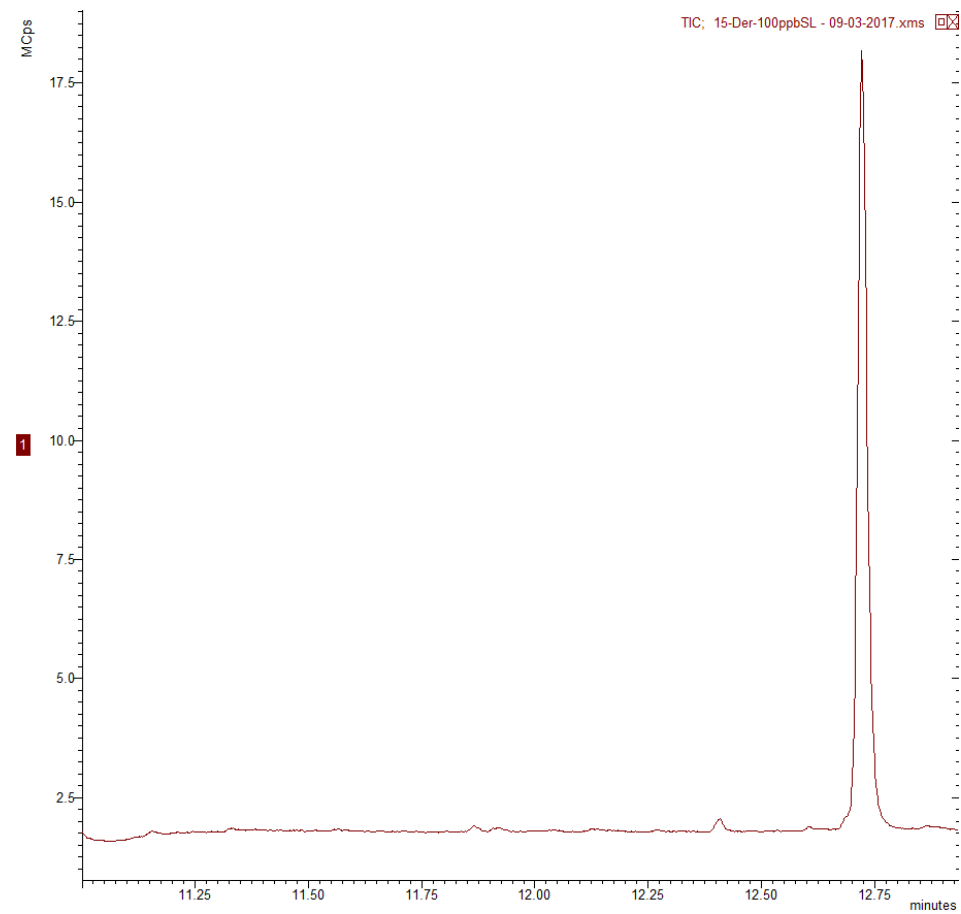
**Figura B 27- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD de 10 ppm derivatizada com HFBA**



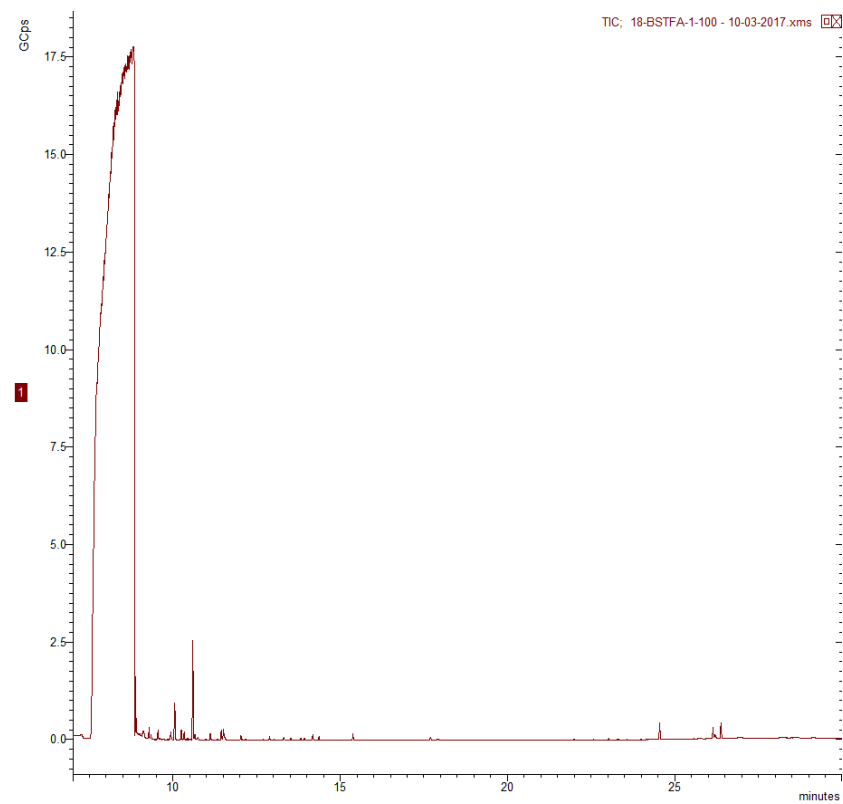
**Figura B 28- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD a 1 ppb derivatizado com HFBA**



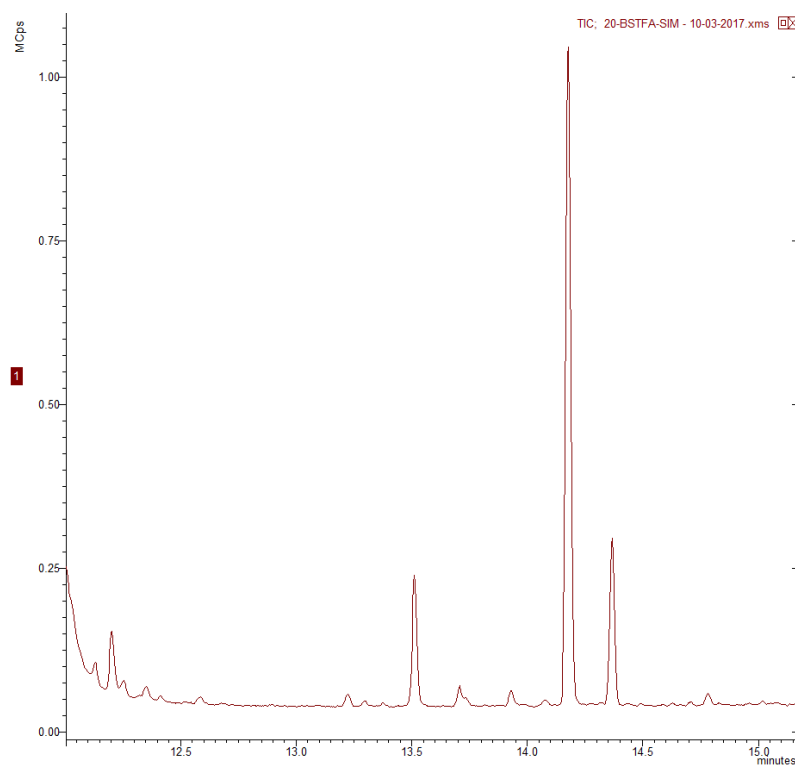
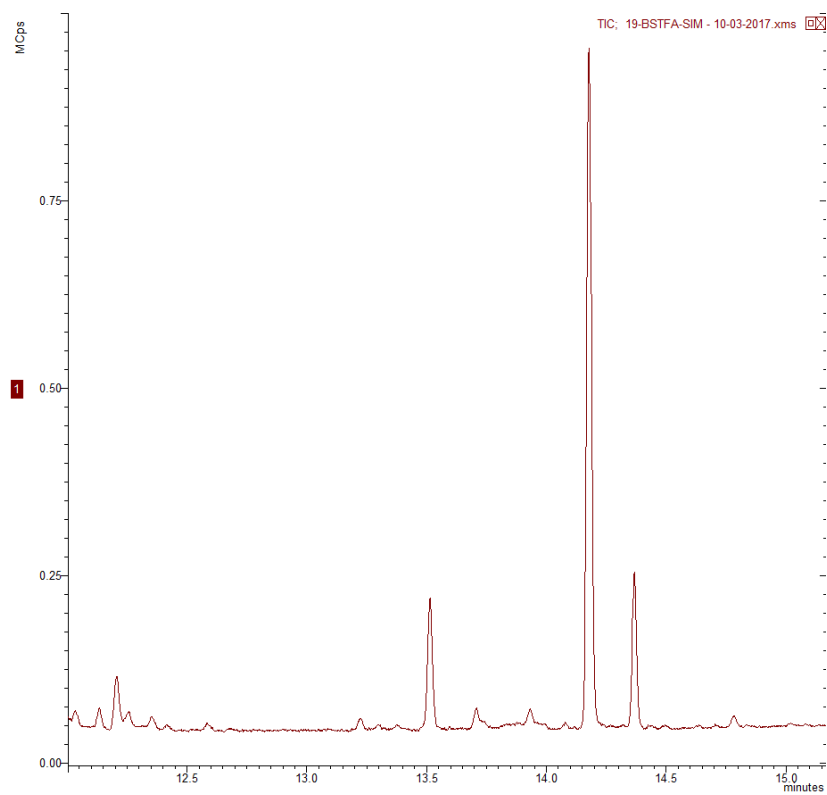
**Figura B 29- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD de 10 ppb derivatizada com HFBA**



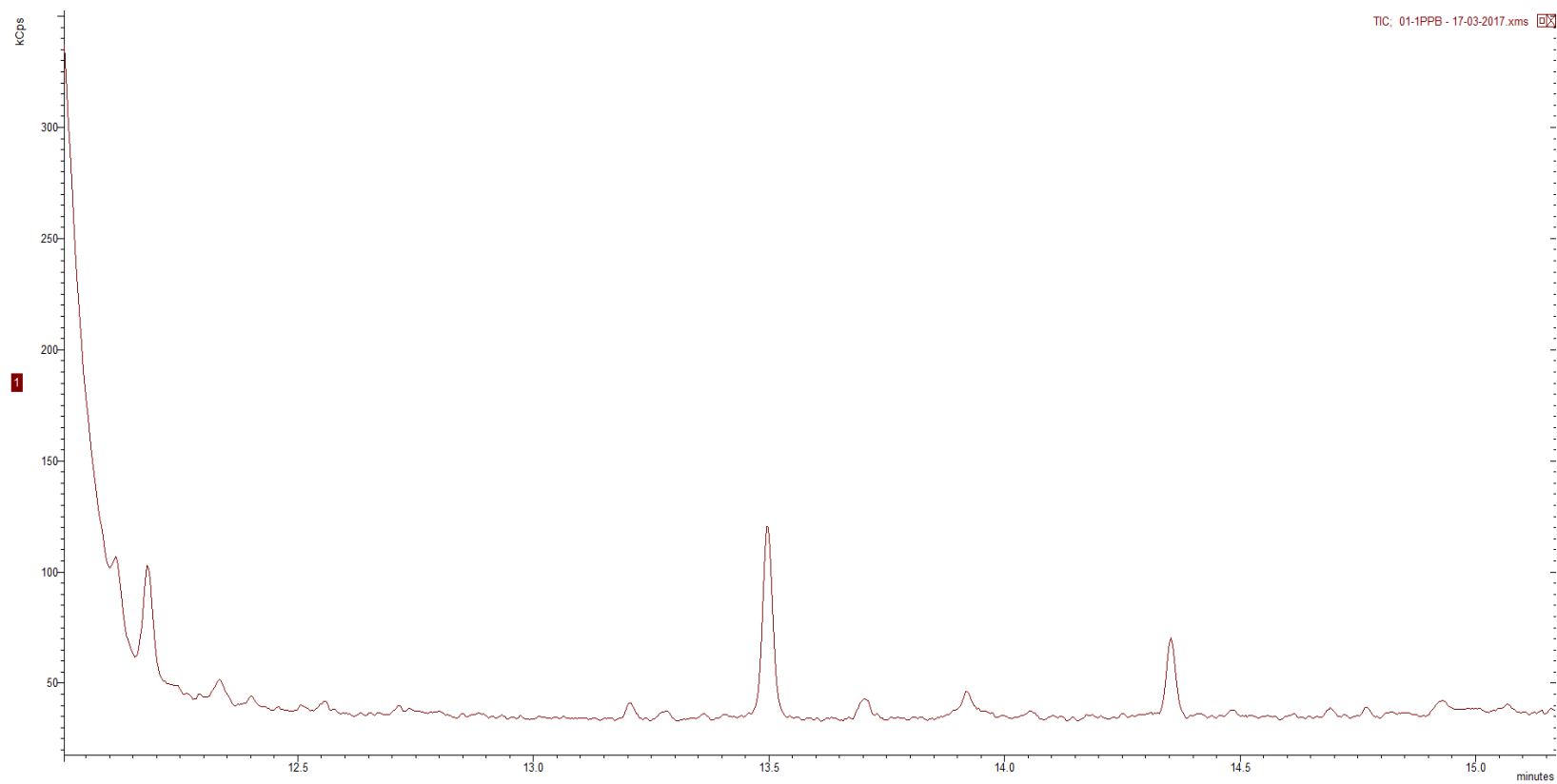
**Figura B 30- TIC referente à solução padrão de 3-MCPD a 100 ppb derivatizada com HFBA**



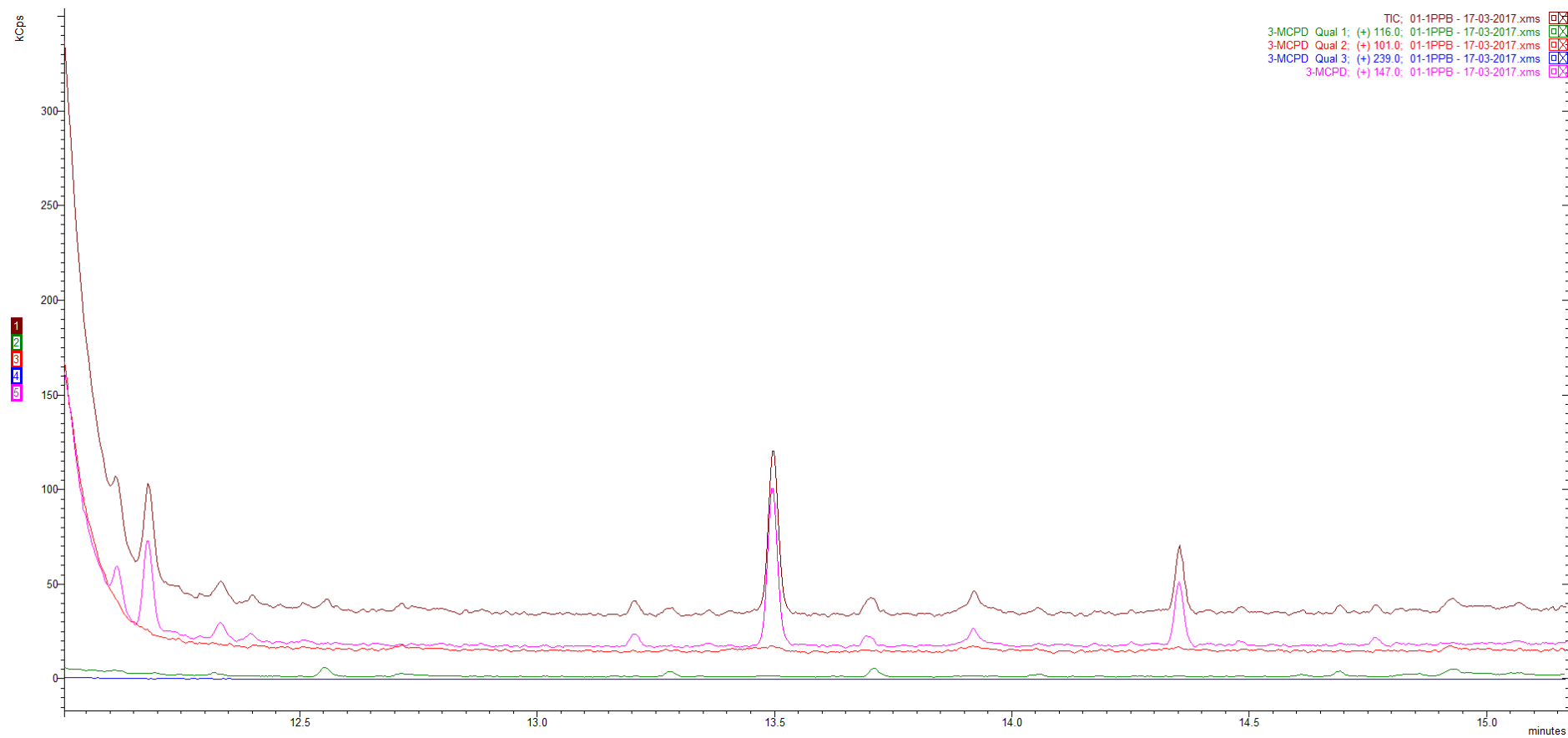
**Figura B 31- TIC referente à derivatização de 3-MCPD com BSTFA**



**Figura B 32- TIC referente à derivatização de 3-MCPD com BSTFA em modo SIM**

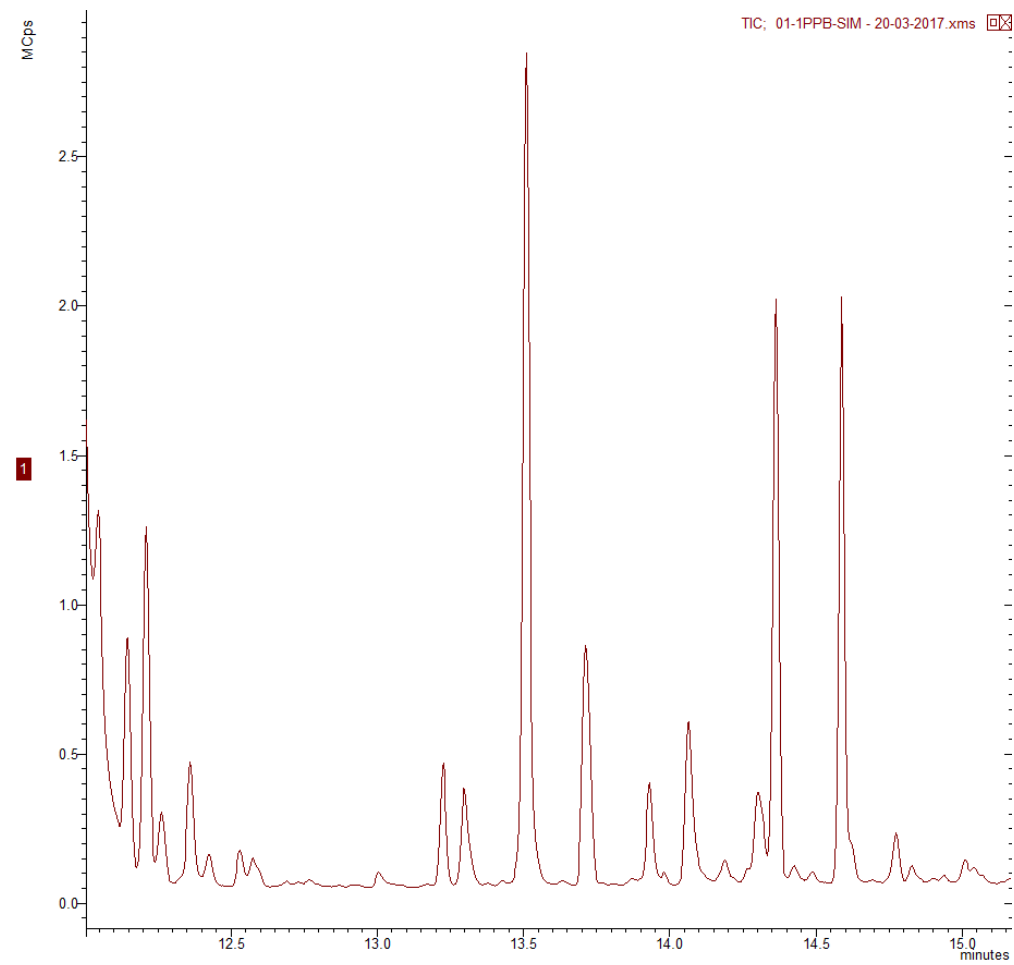


**Figura B 33- TIC da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb**

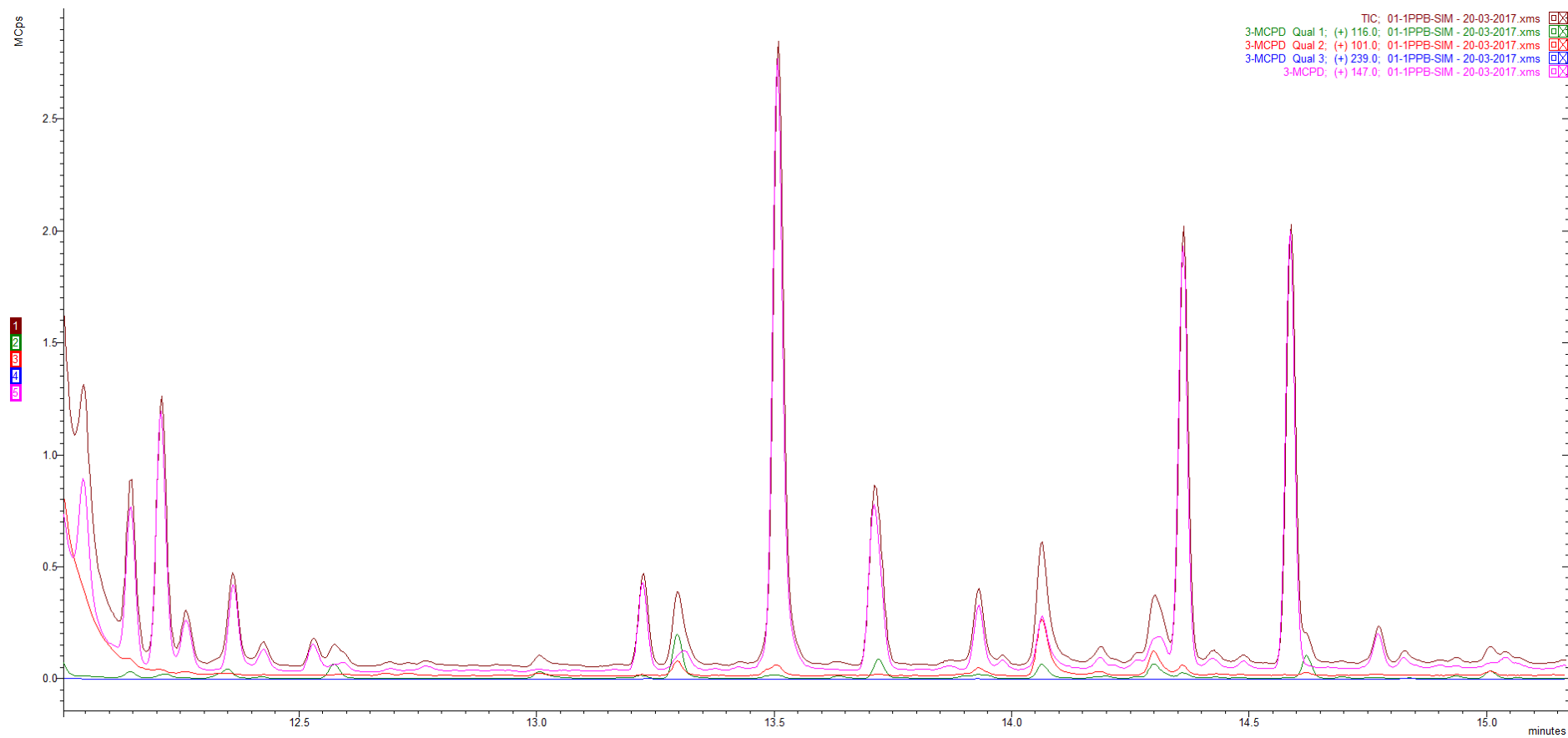


**Figura B 34-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb com chamada dos vários iões**

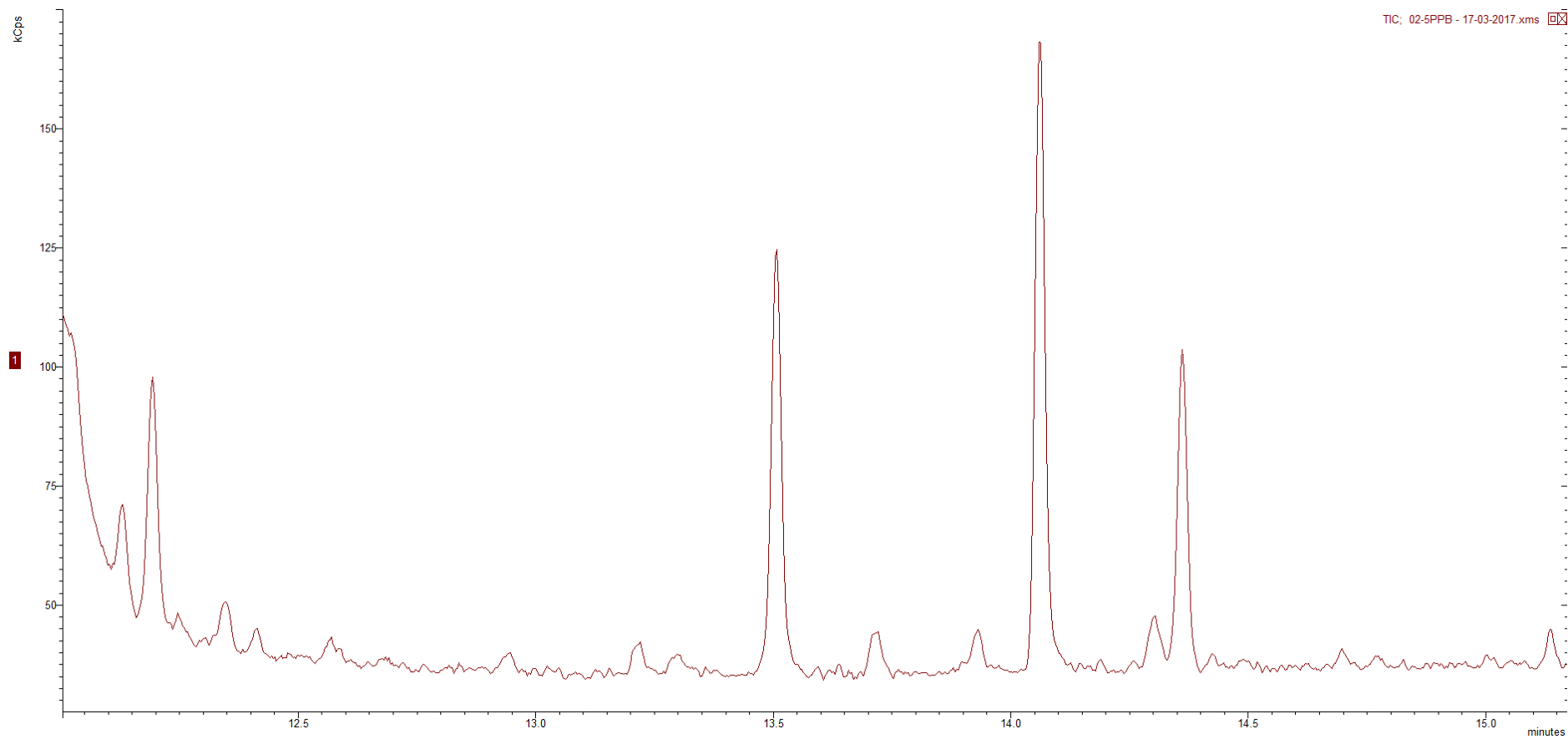




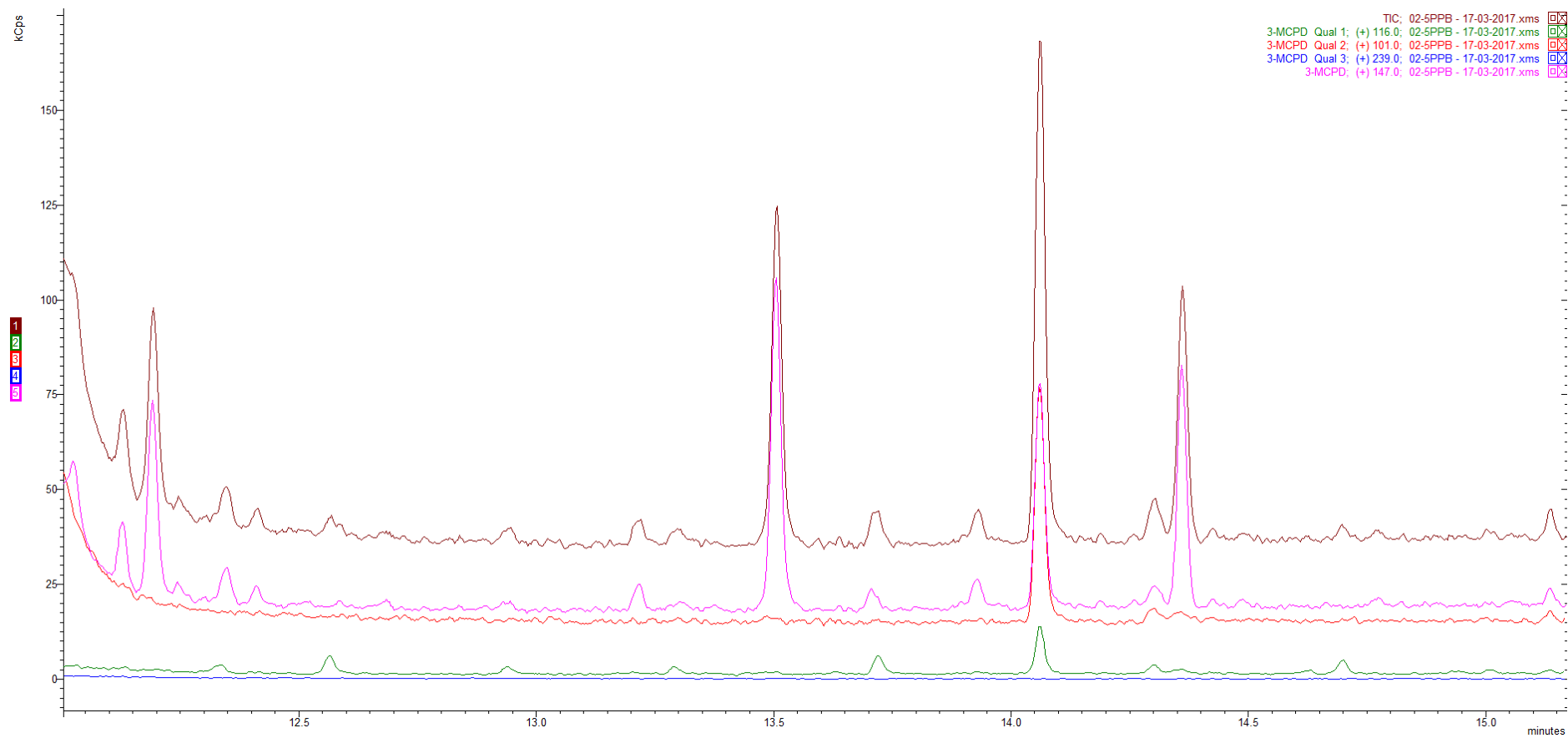
**Figura B 35- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb- Modo SIM**



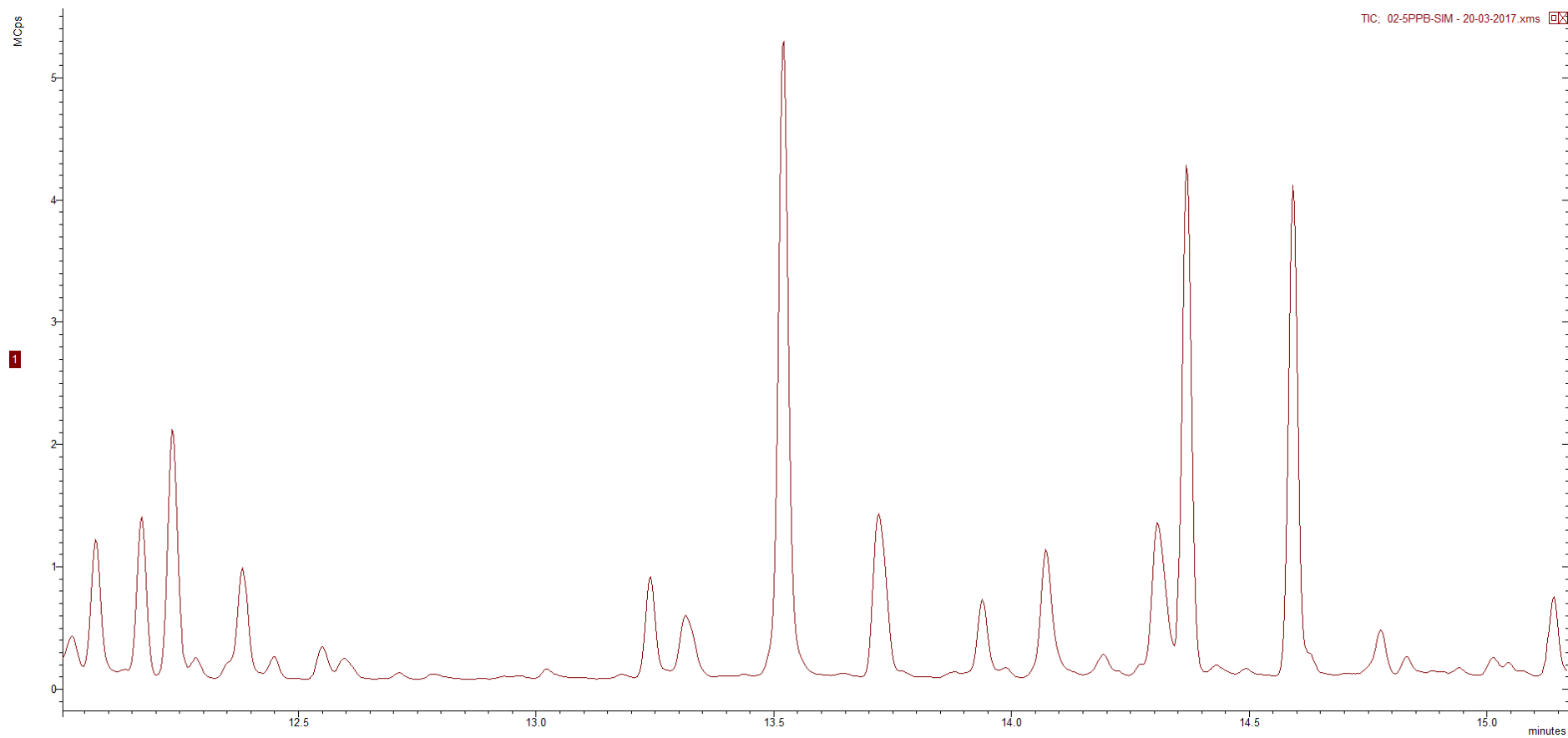
**Figura B 36 – Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 1 ppb- Modo SIM com vários iões**



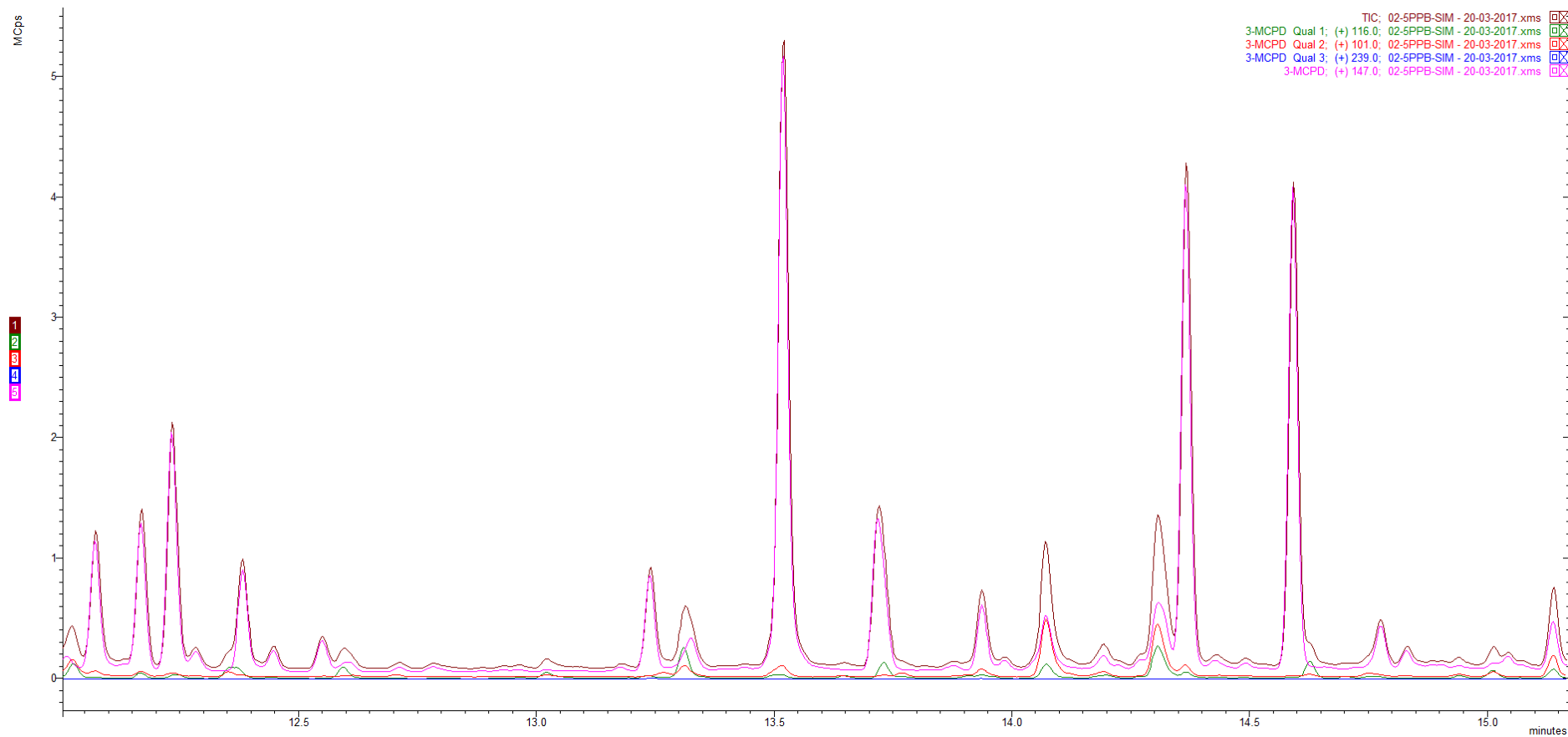
**Figura B 37- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb**



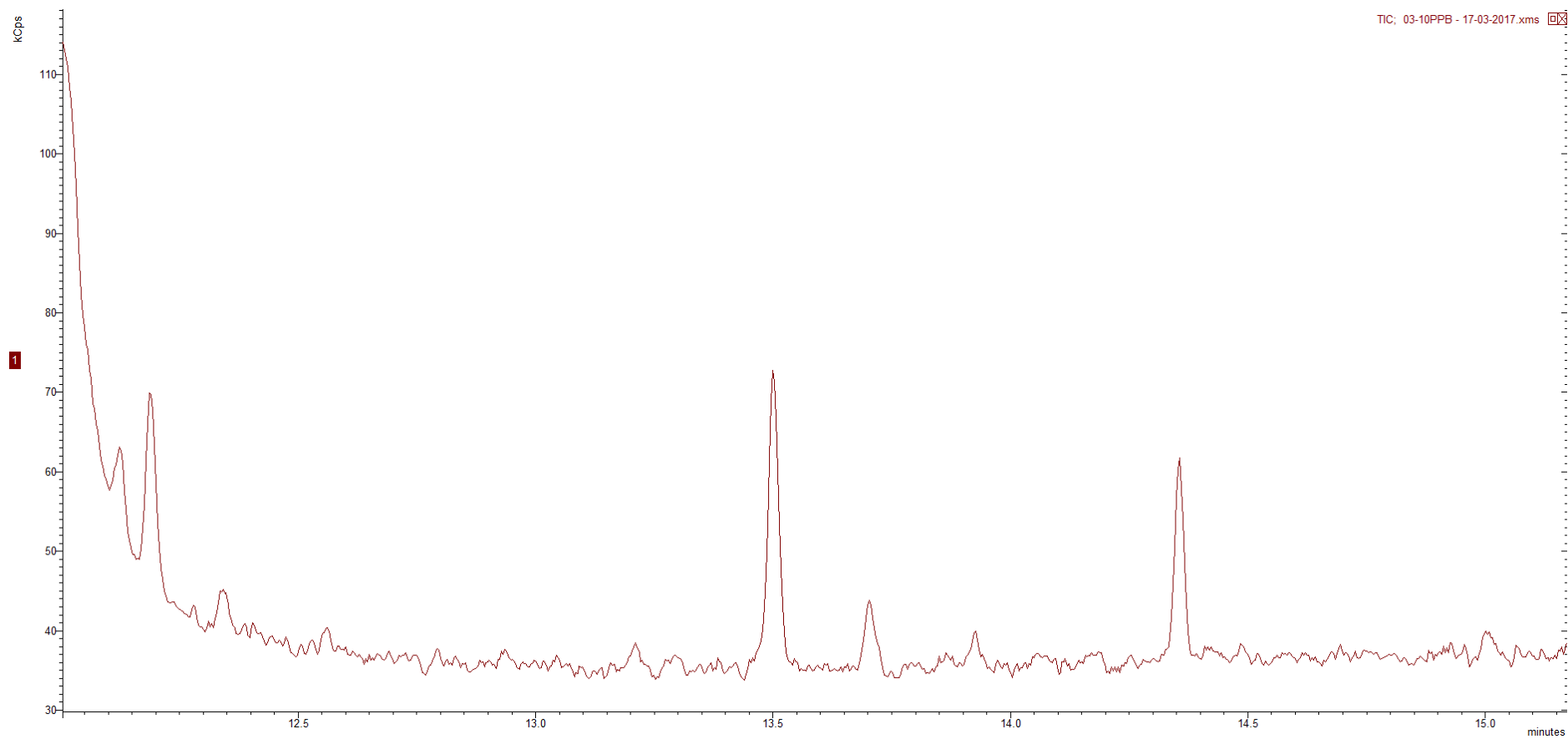
**Figura B 38- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb com vários iões**



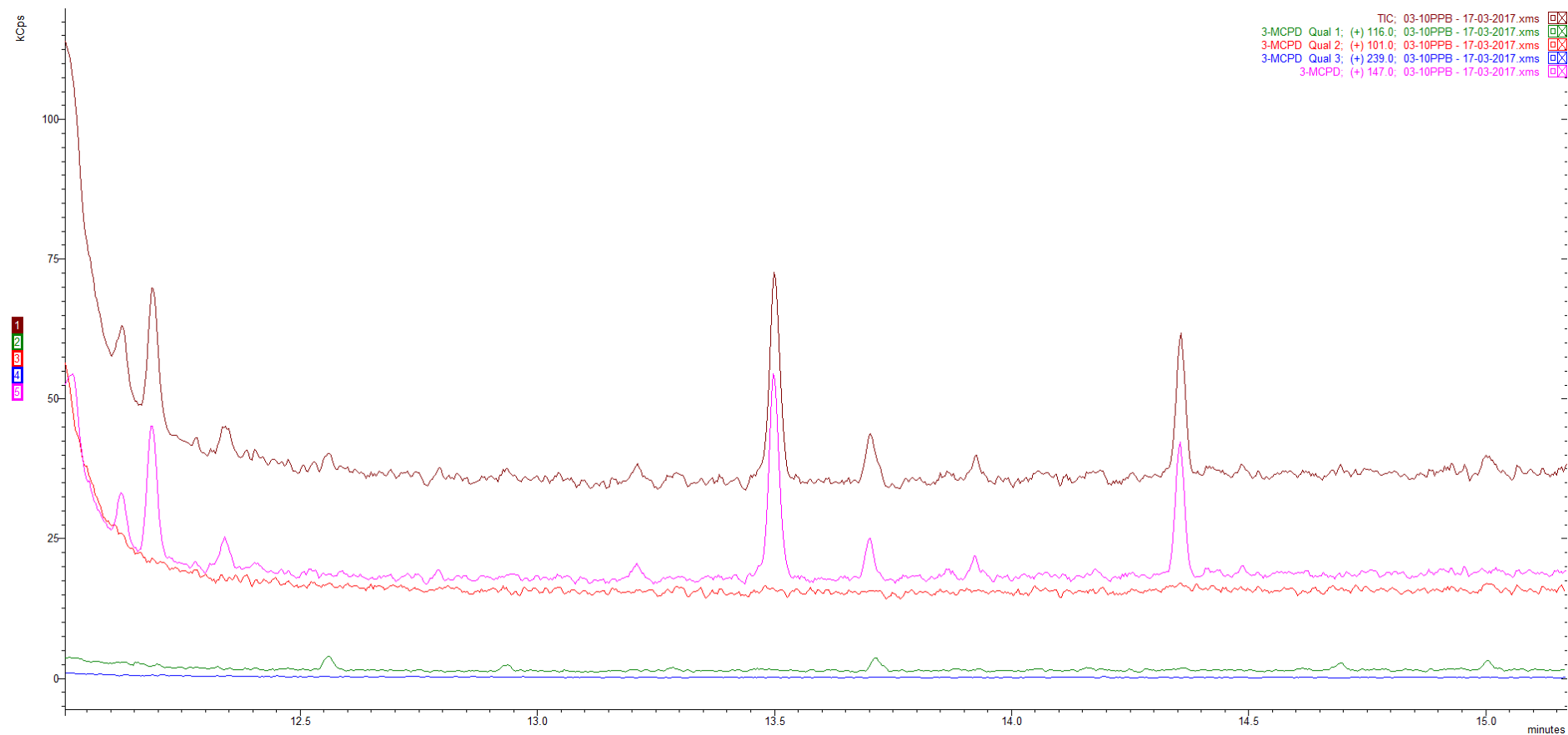
**Figura B 39-TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb- Modo SIM**



**Figura B 40- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 5 ppb- Modo SIM com vários iões**

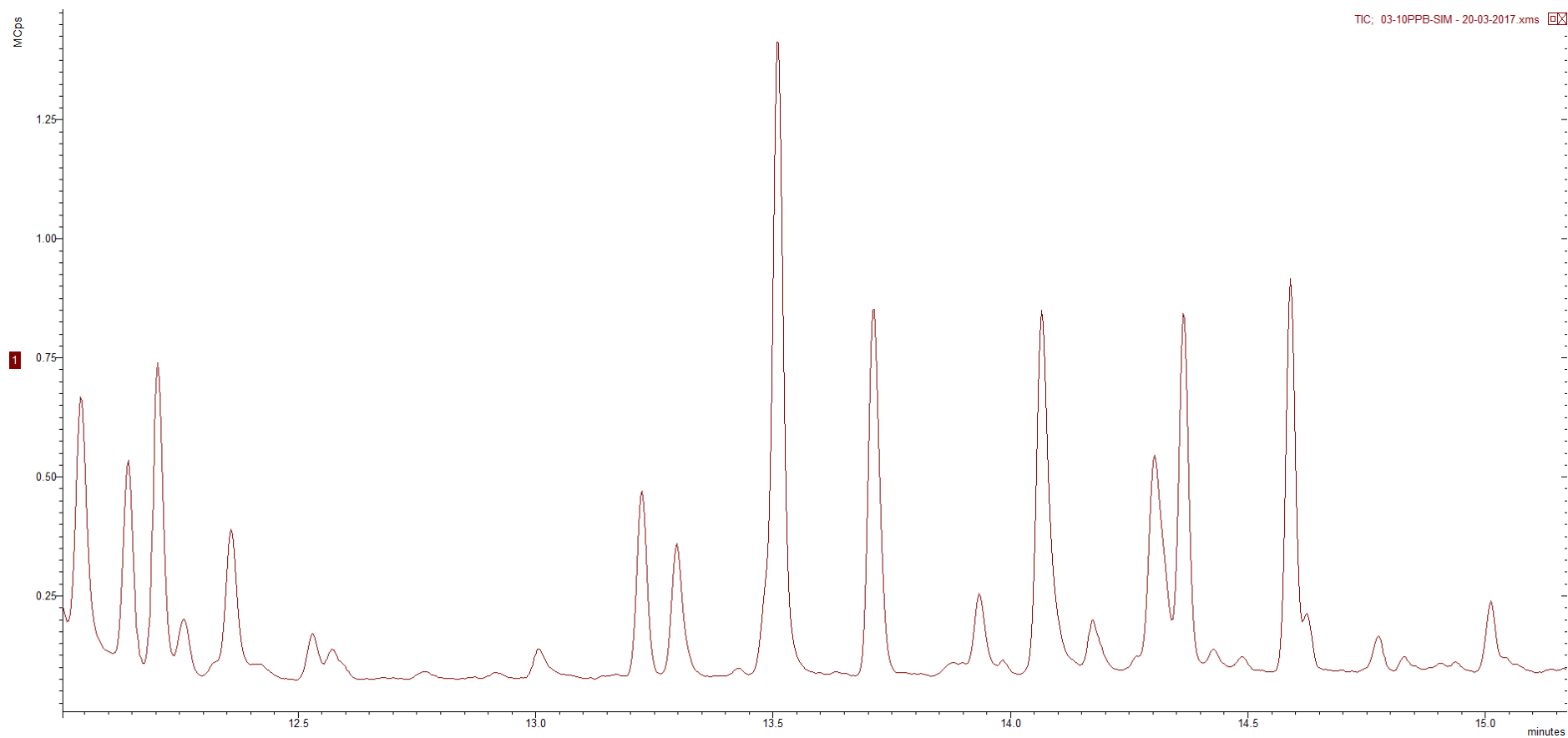


**Figura B 41- TIC Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb**

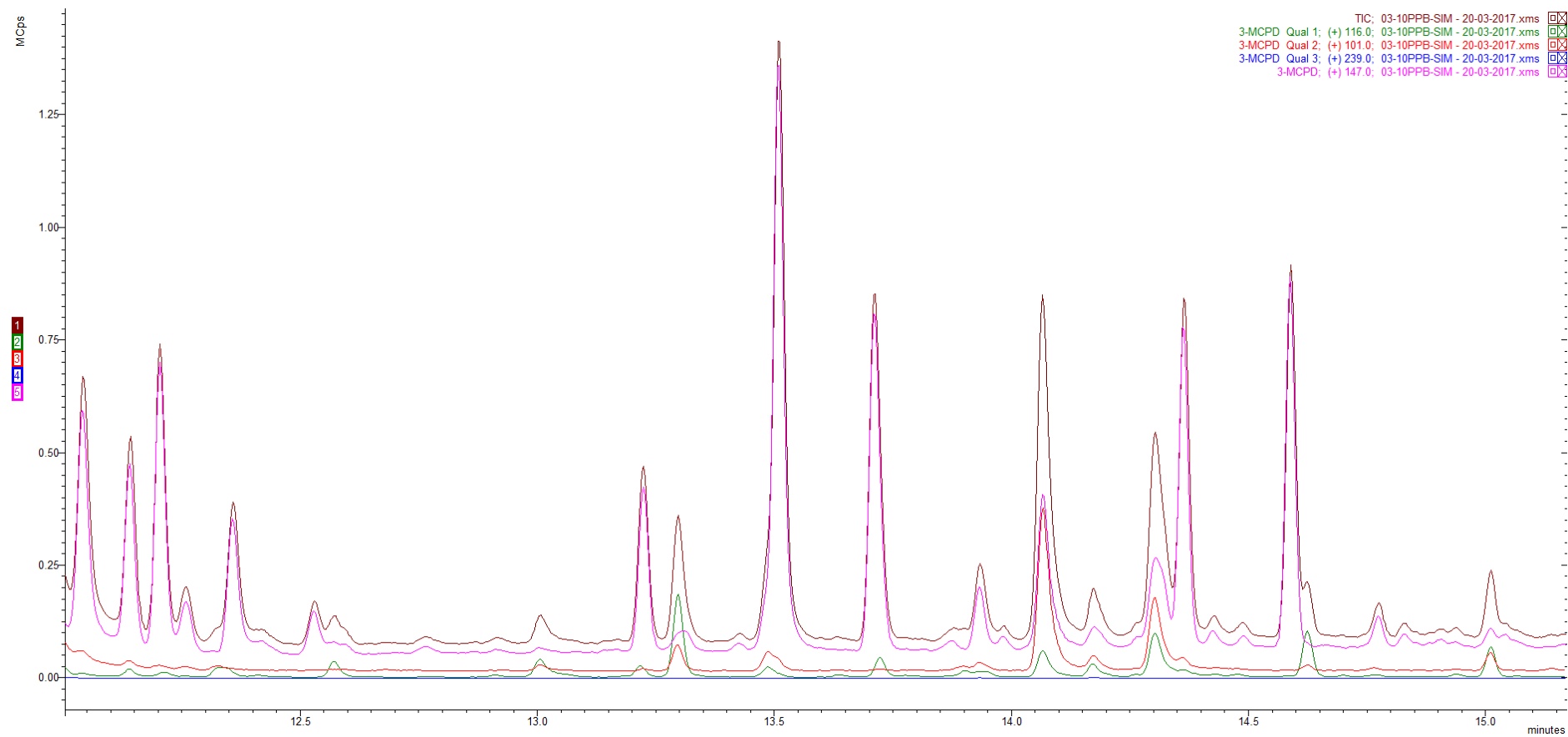


**Figura B 42- Cromatograma da sobreposição da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb com vários iões**

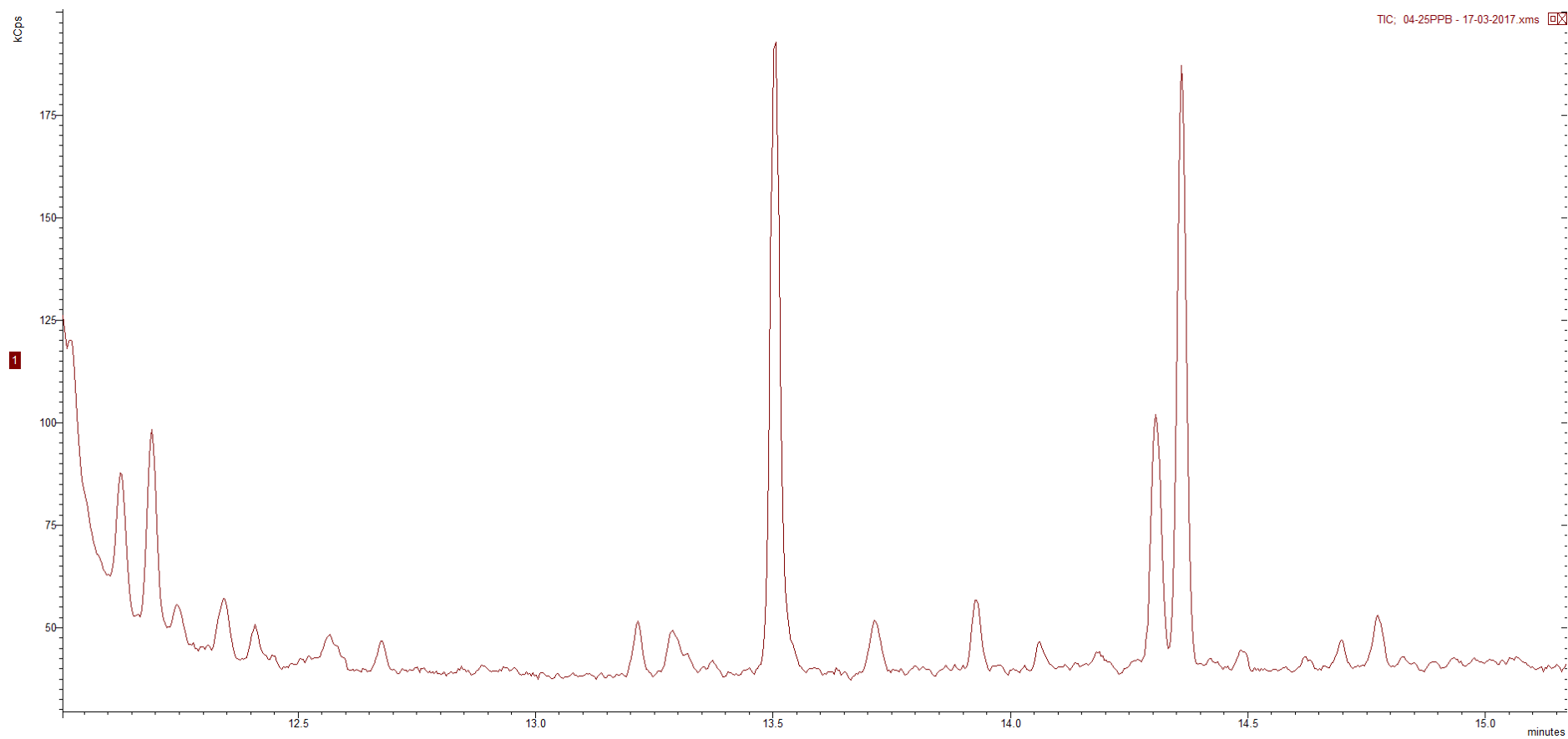




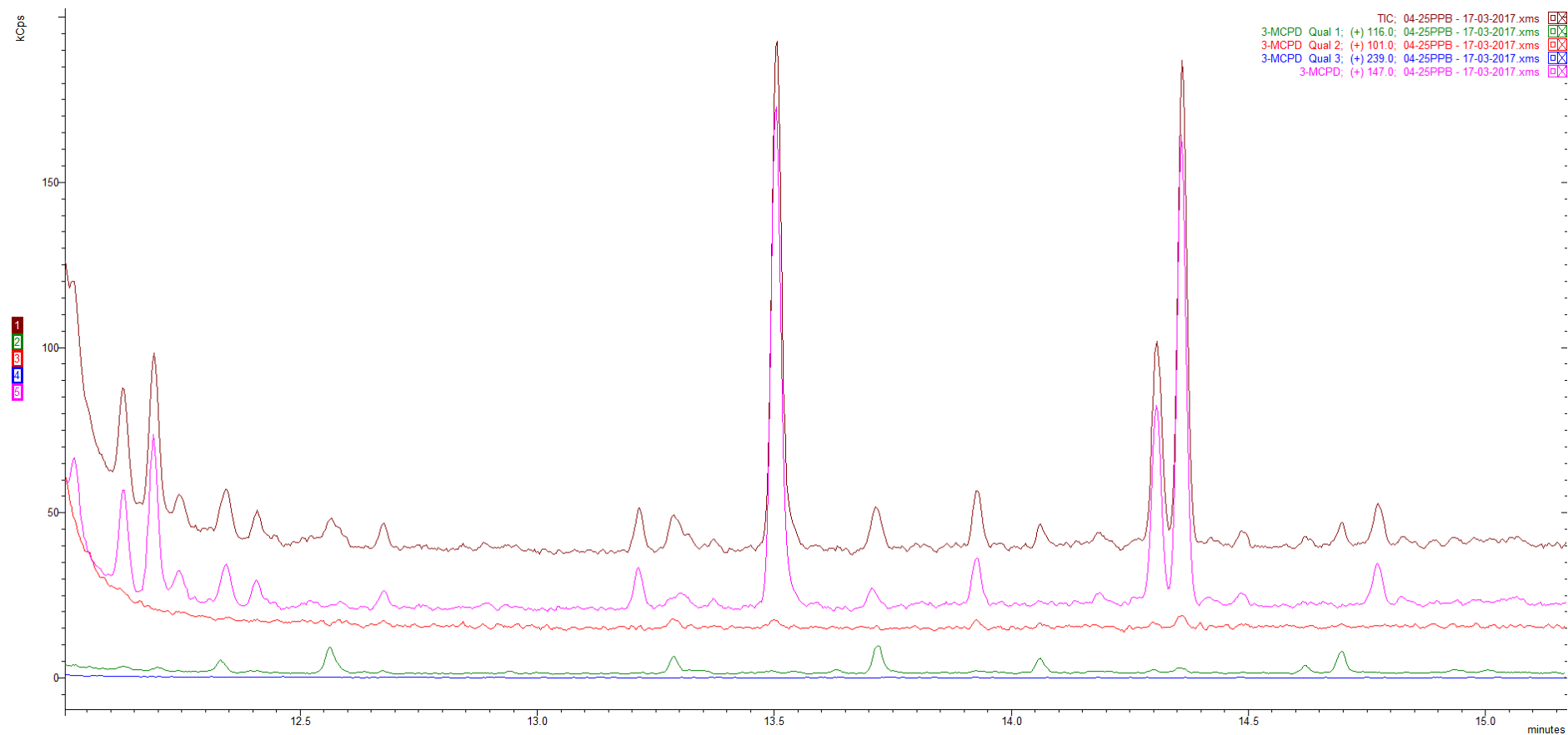
**Figura B 43- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb- Modo SIM**



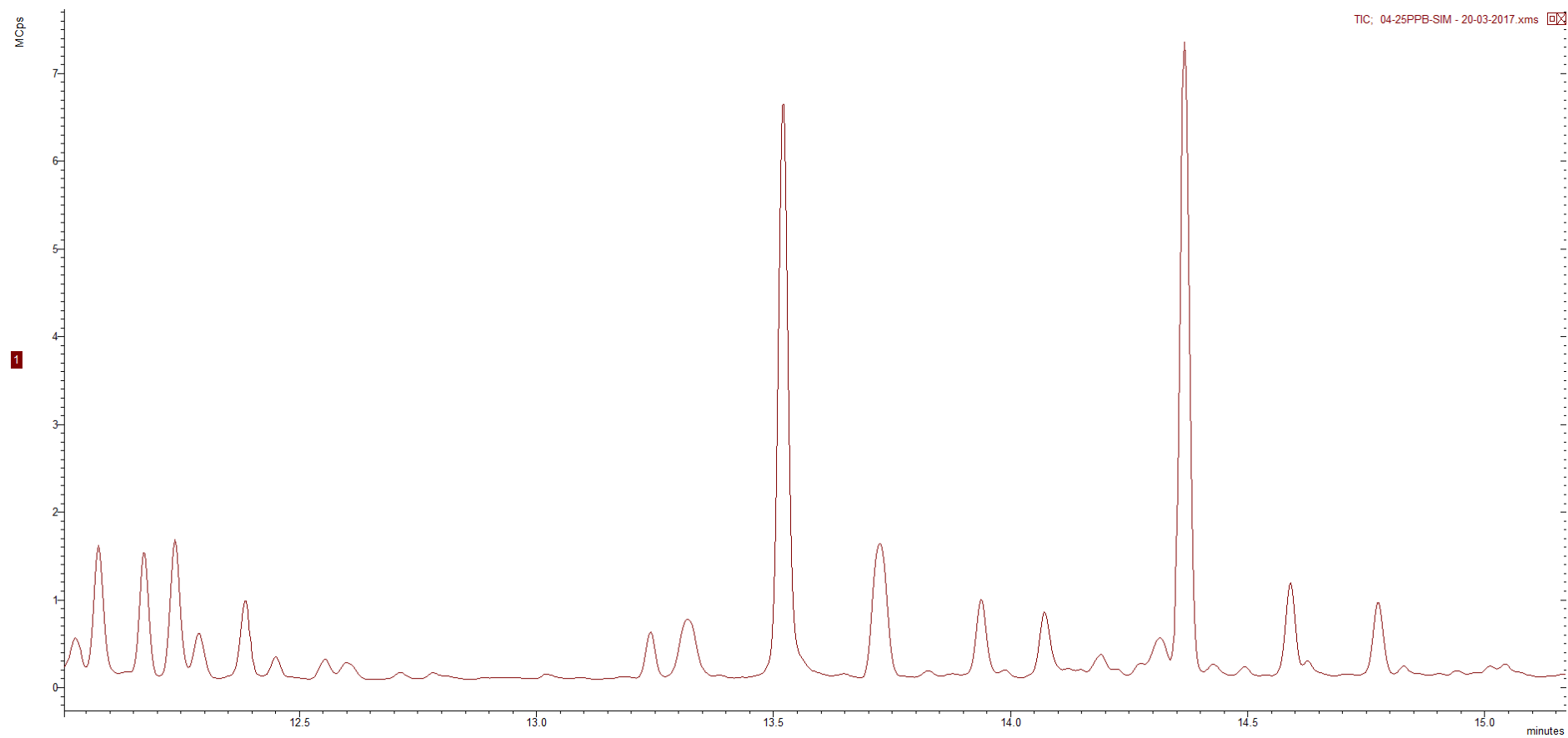
**Figura B 44- Cromatograma da sobreposição Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 10 ppb- Modo SIM com vários iões**



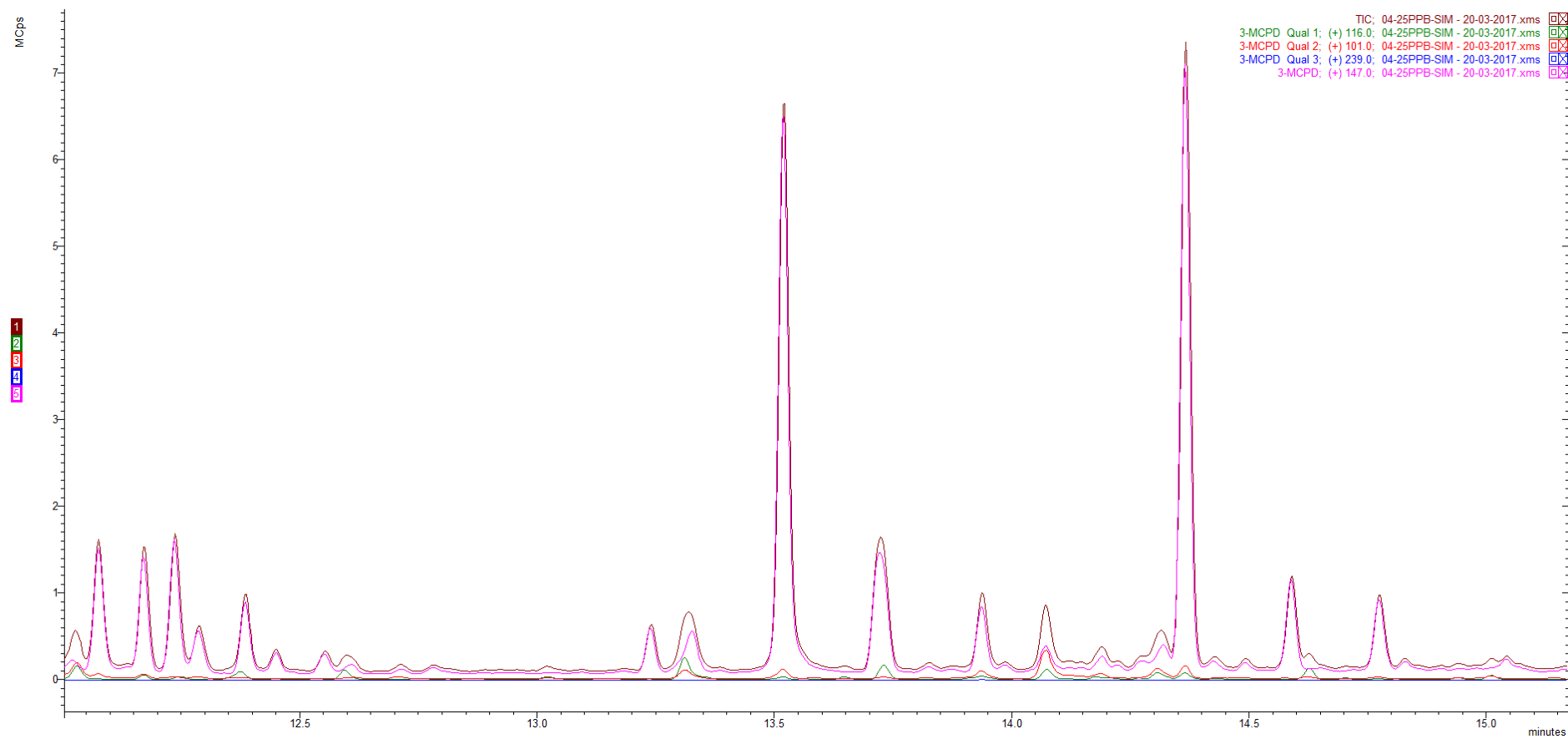
**Figura B 45- TIC da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb**



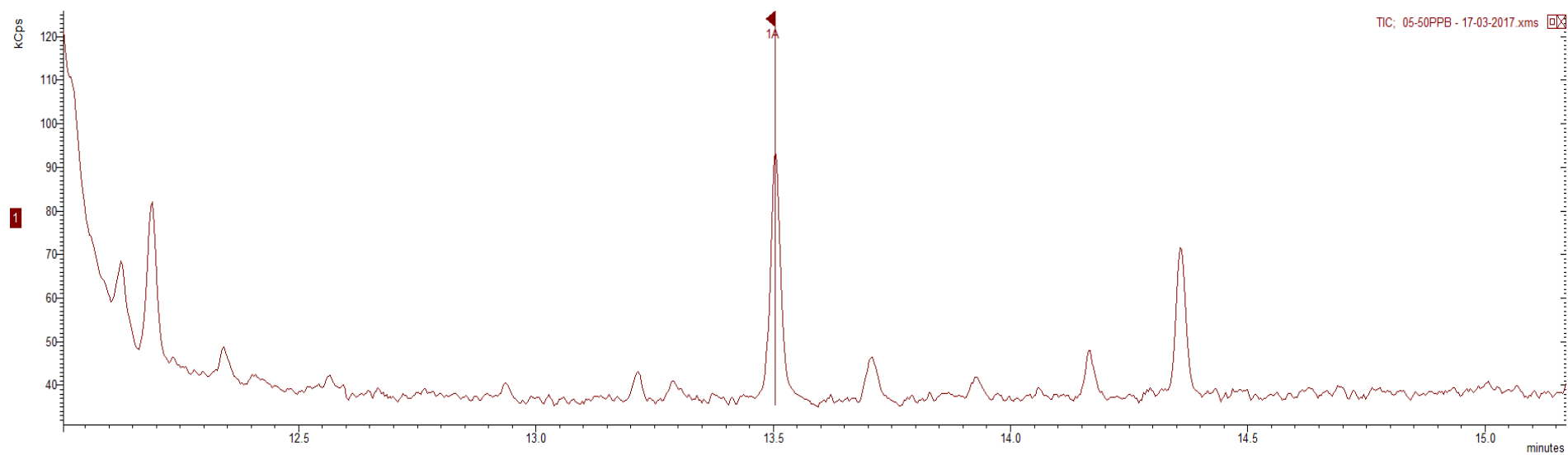
**Figura B 46- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb com vários iões**



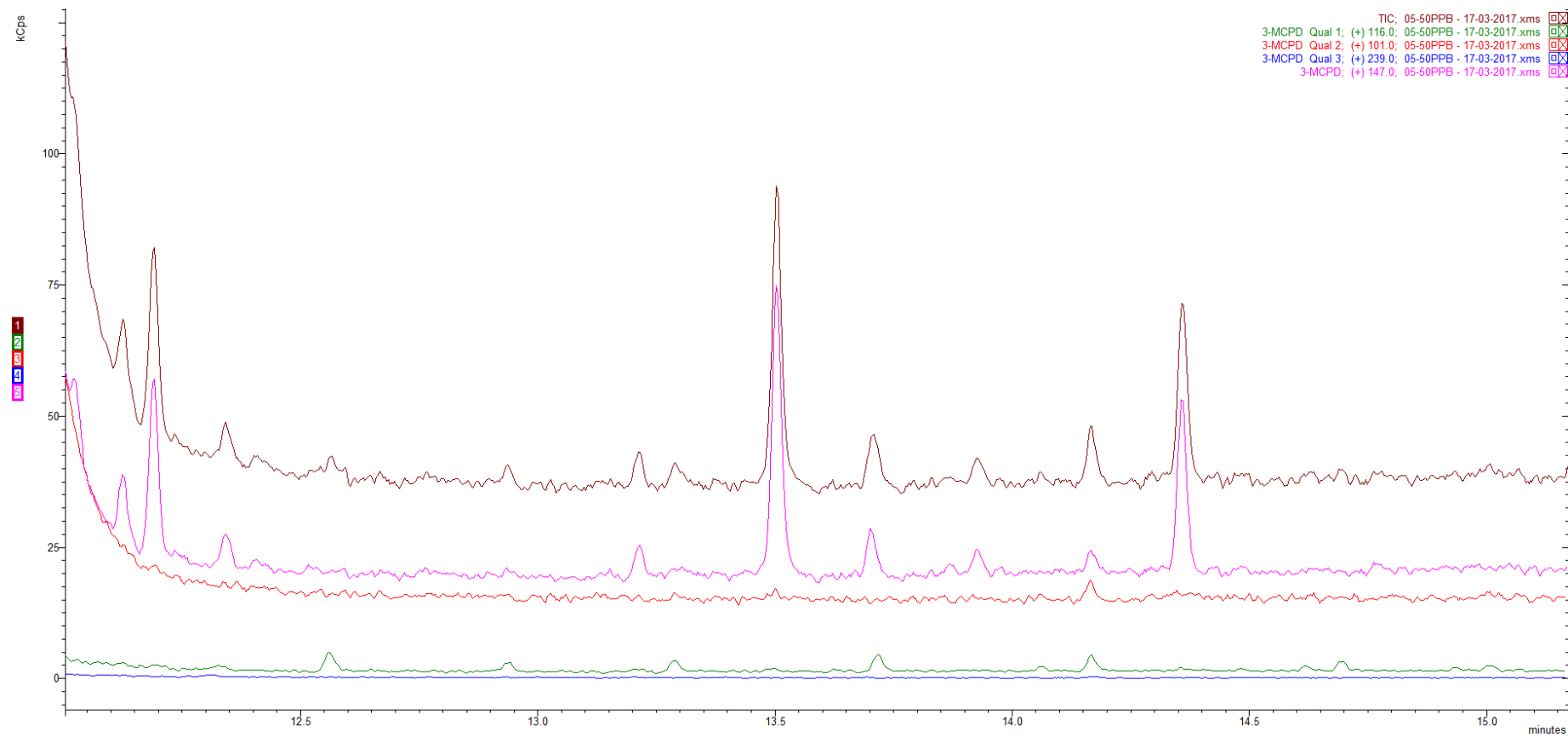
**Figura B 47- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb- Modo SIM**



**Figura B 48- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 25 ppb- Modo SIM com vários íões**

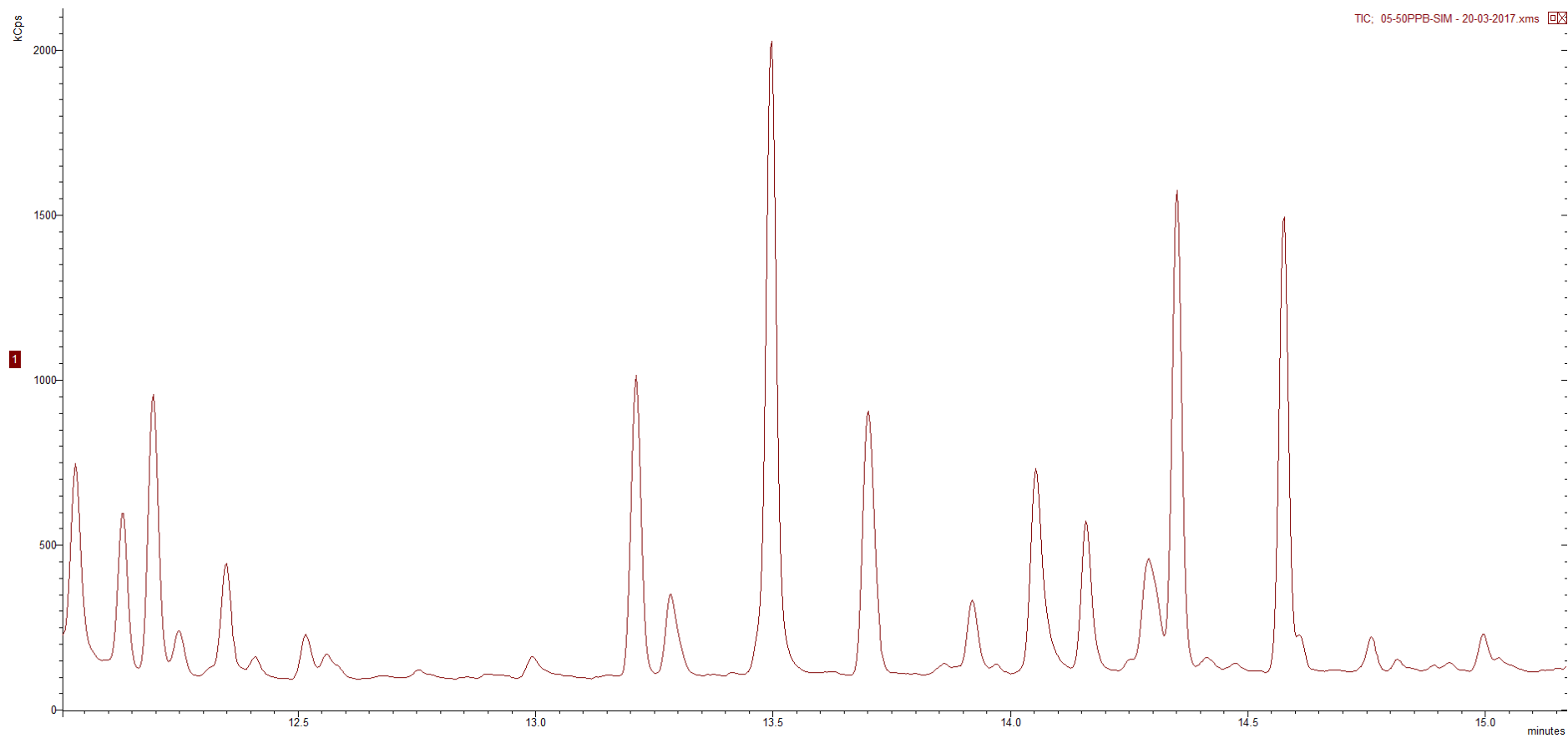


**Figura B 49- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb**

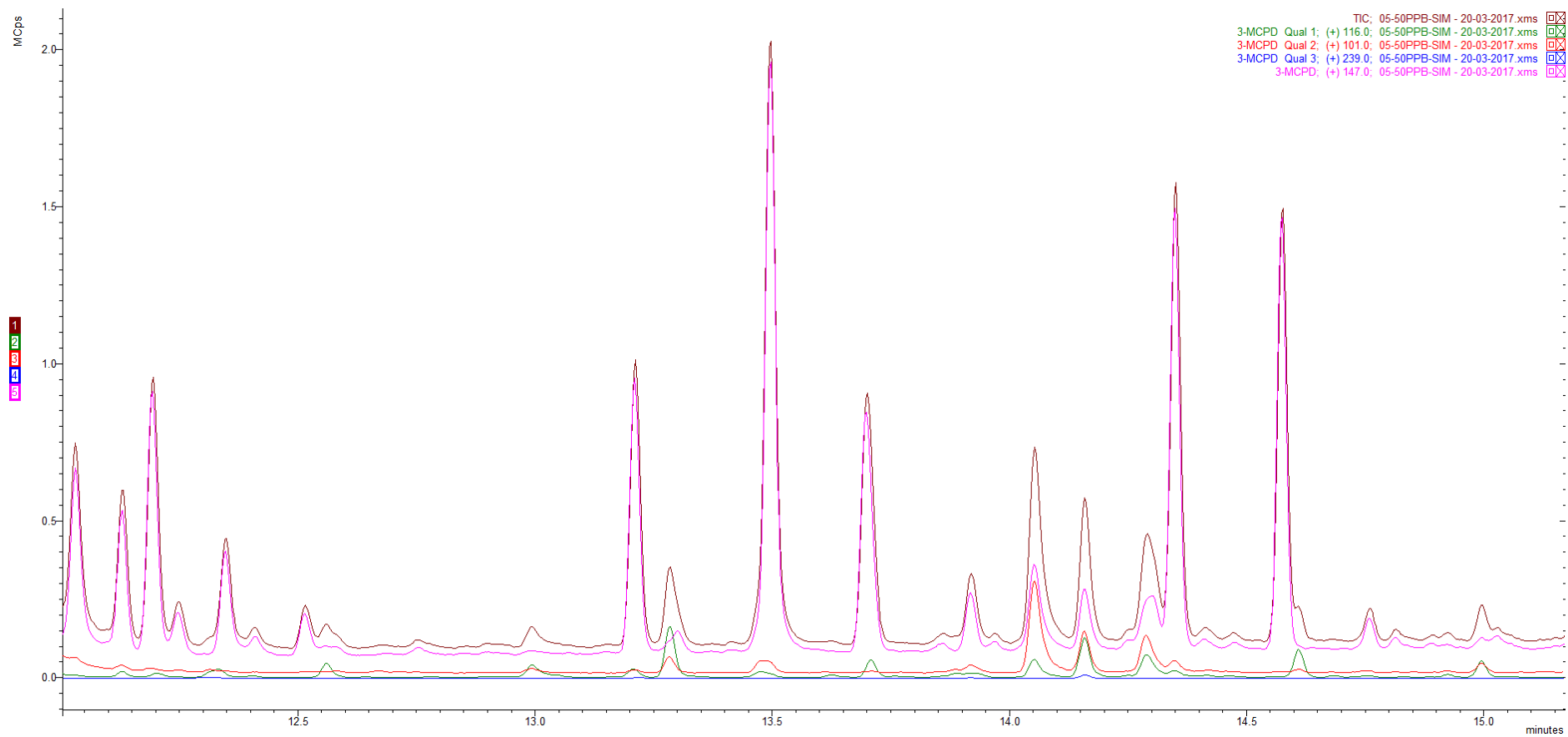


**Figura B 50- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb com vários iões**

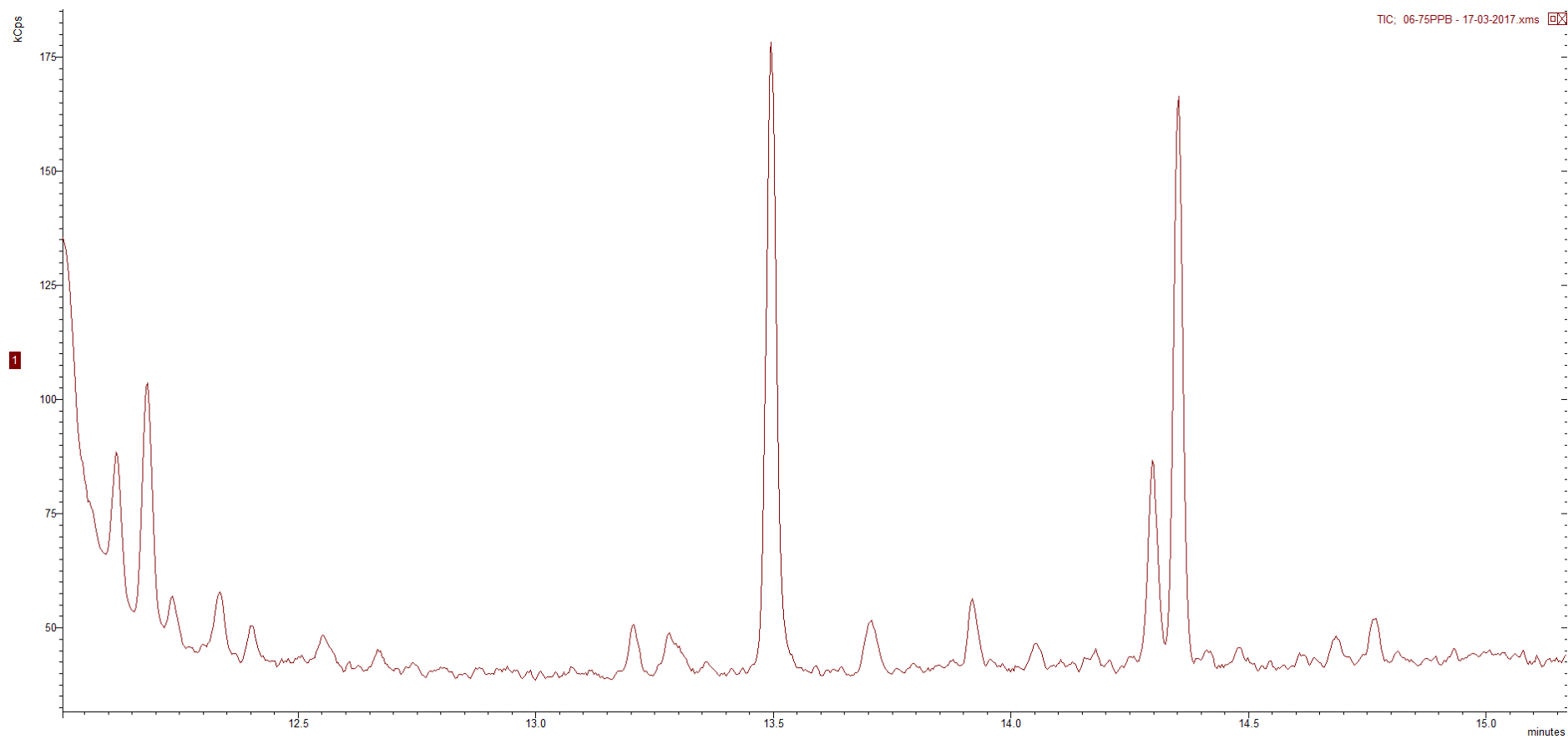




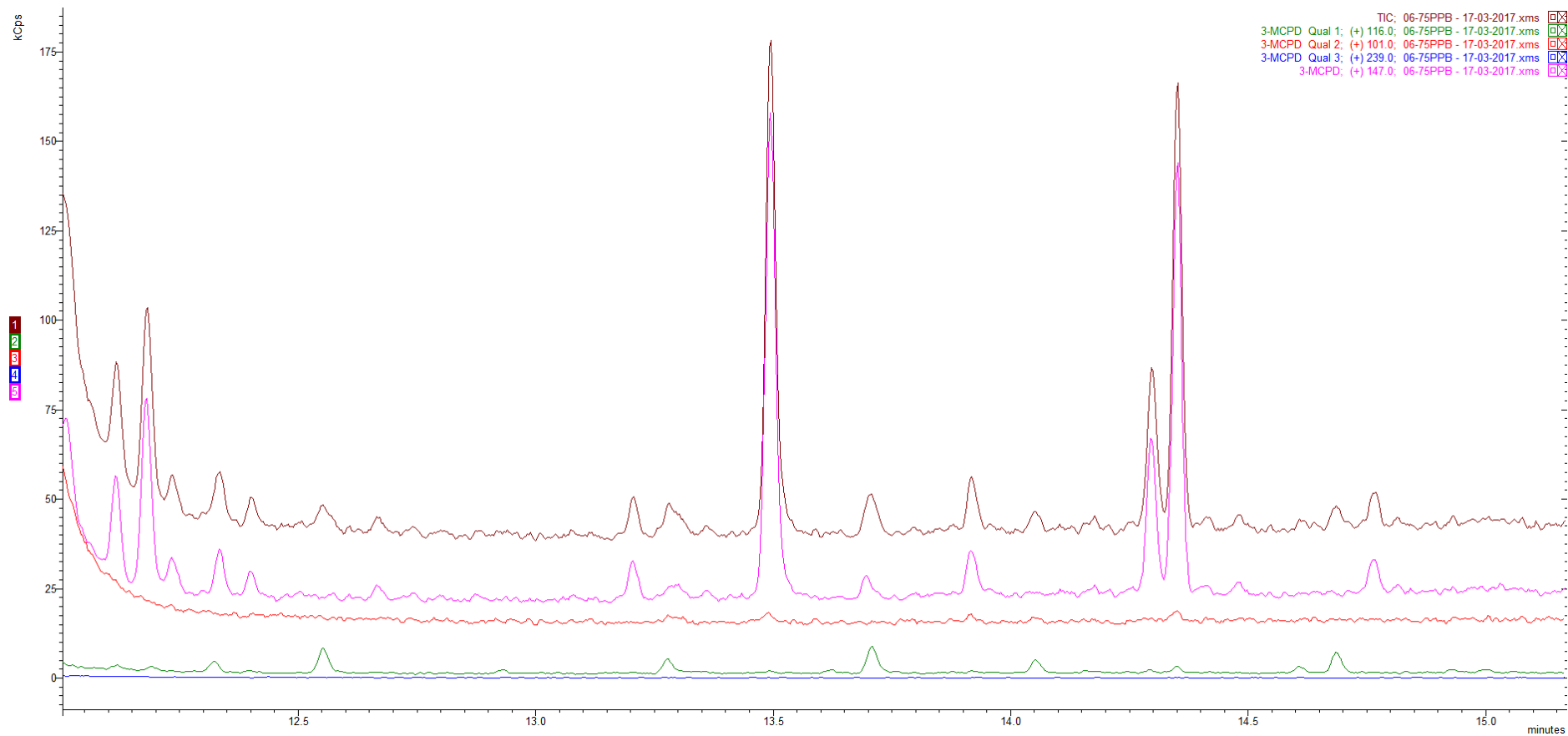
**Figura B 51- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb- Modo SIM**



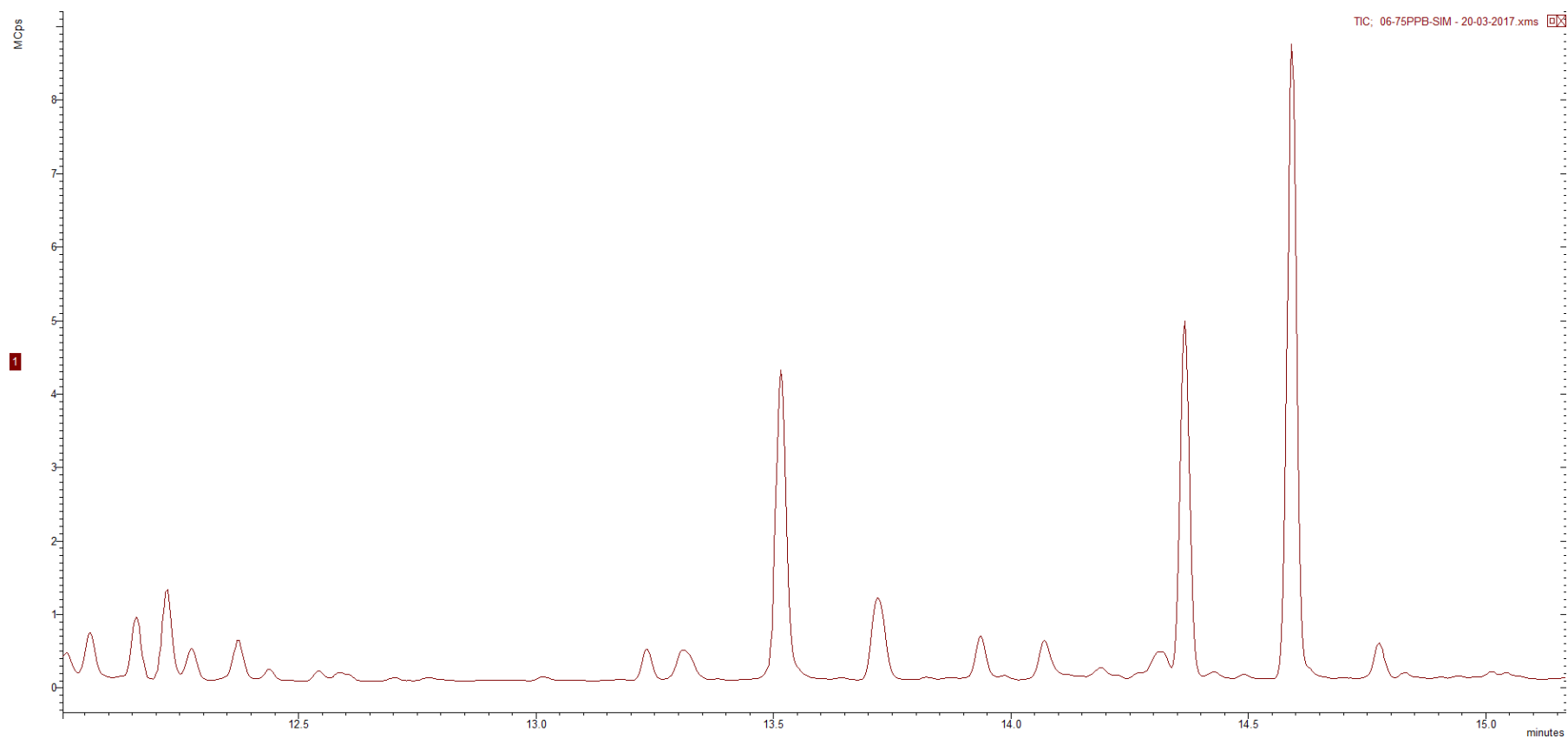
**Figura B 52- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 50 ppb- Modo SIM com vários iões**



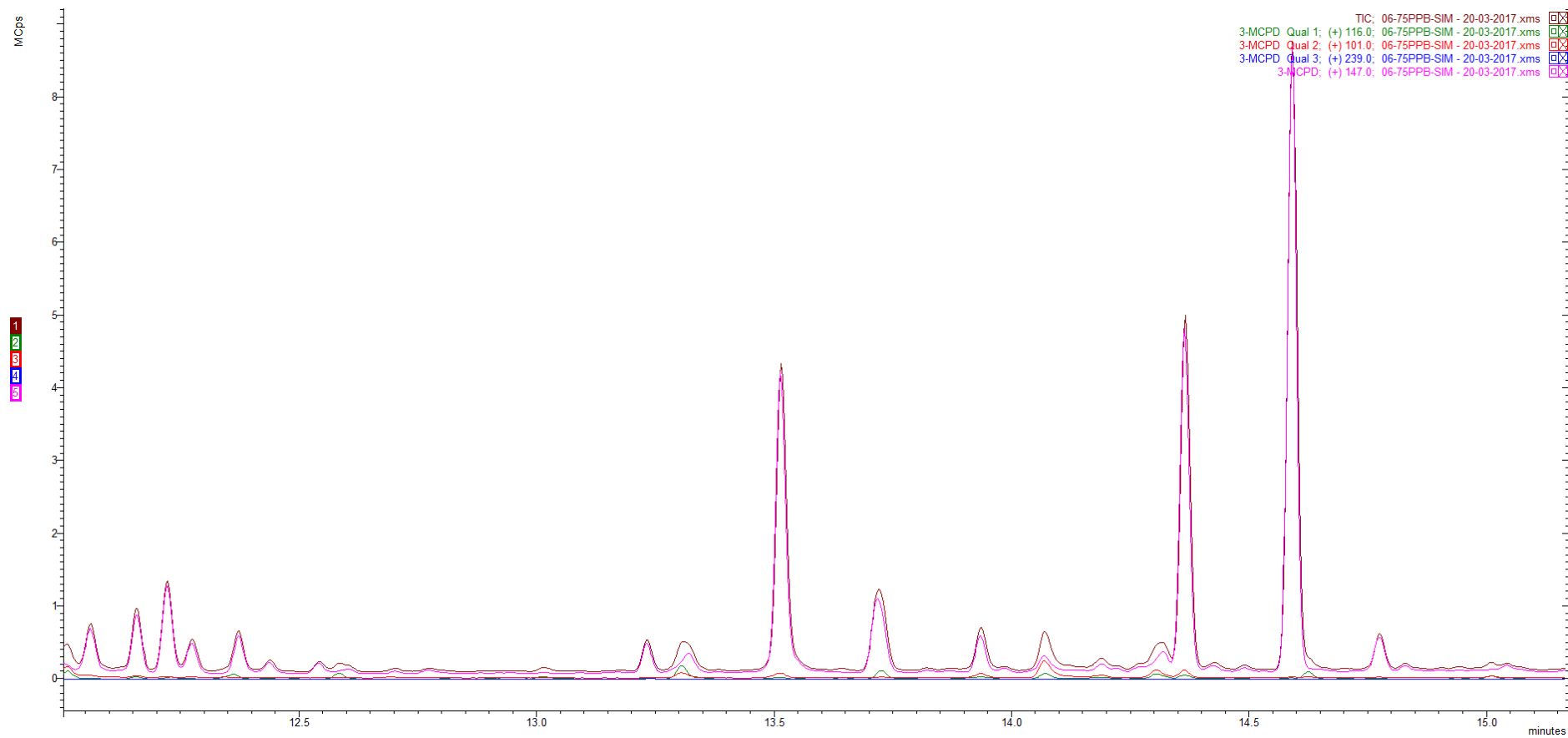
**Figura B 53-TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb**



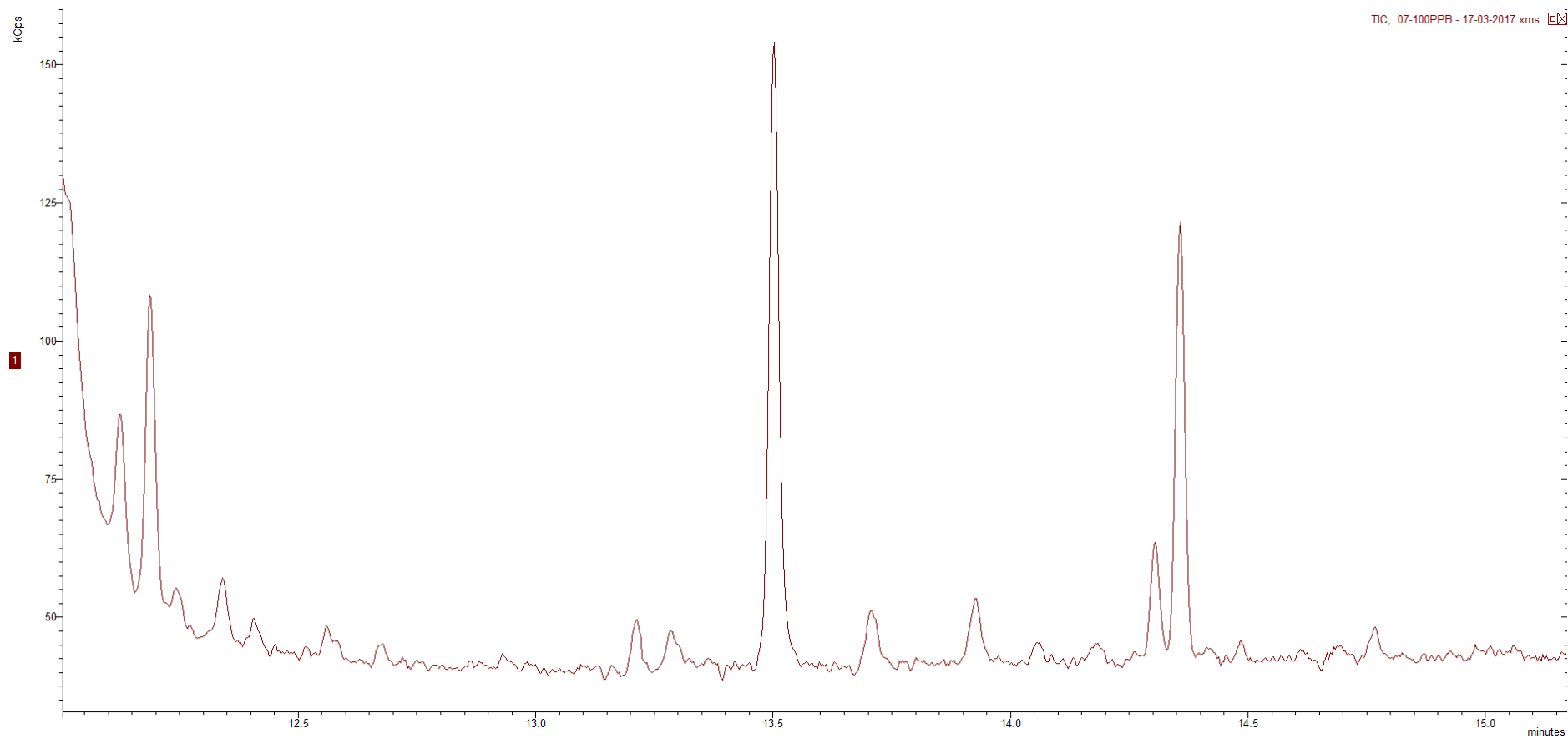
**Figura B 54- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb- com vários iões**



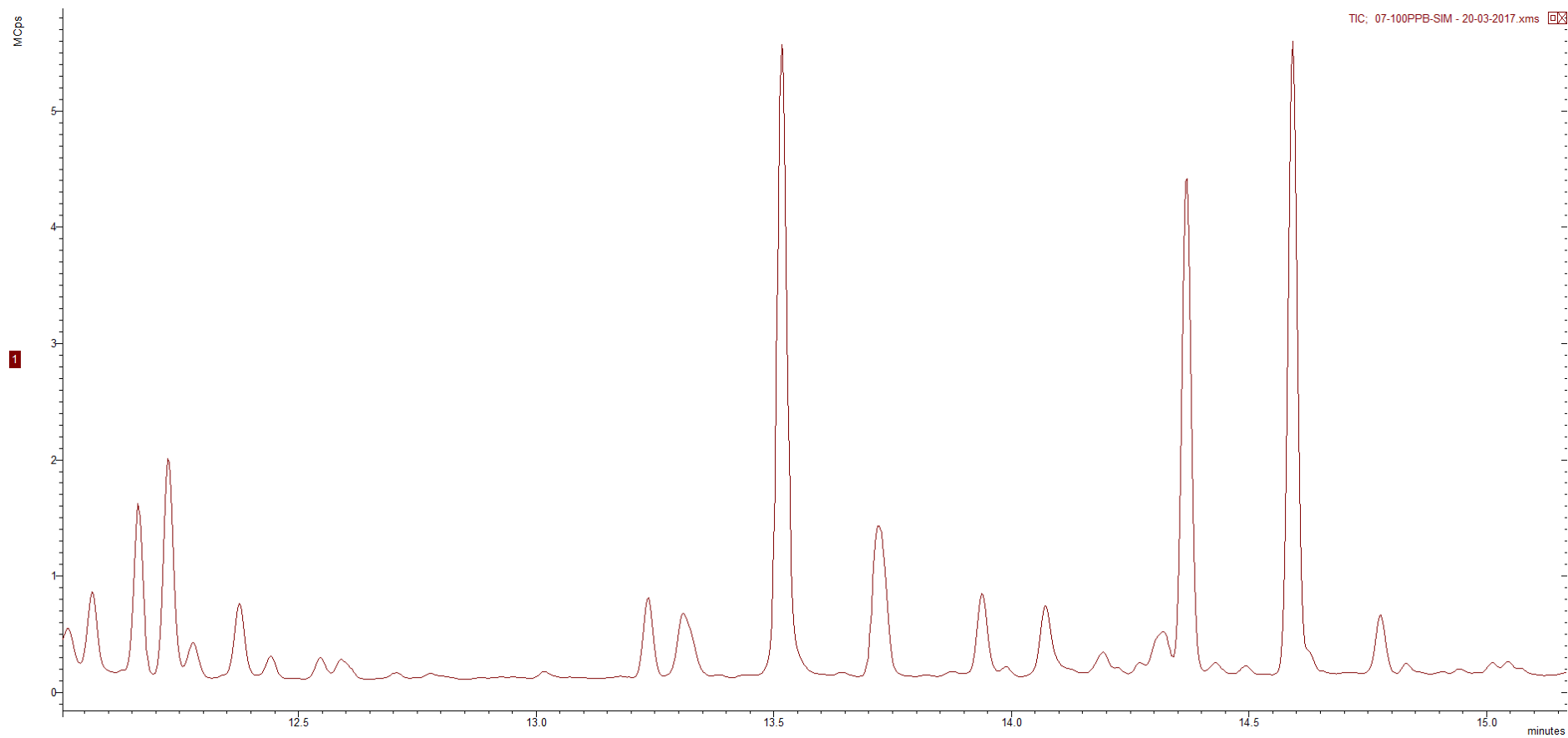
**Figura B 55- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb- Modo SIM**



**Figura B 56- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 75 ppb- Modo SIM com vários iões**

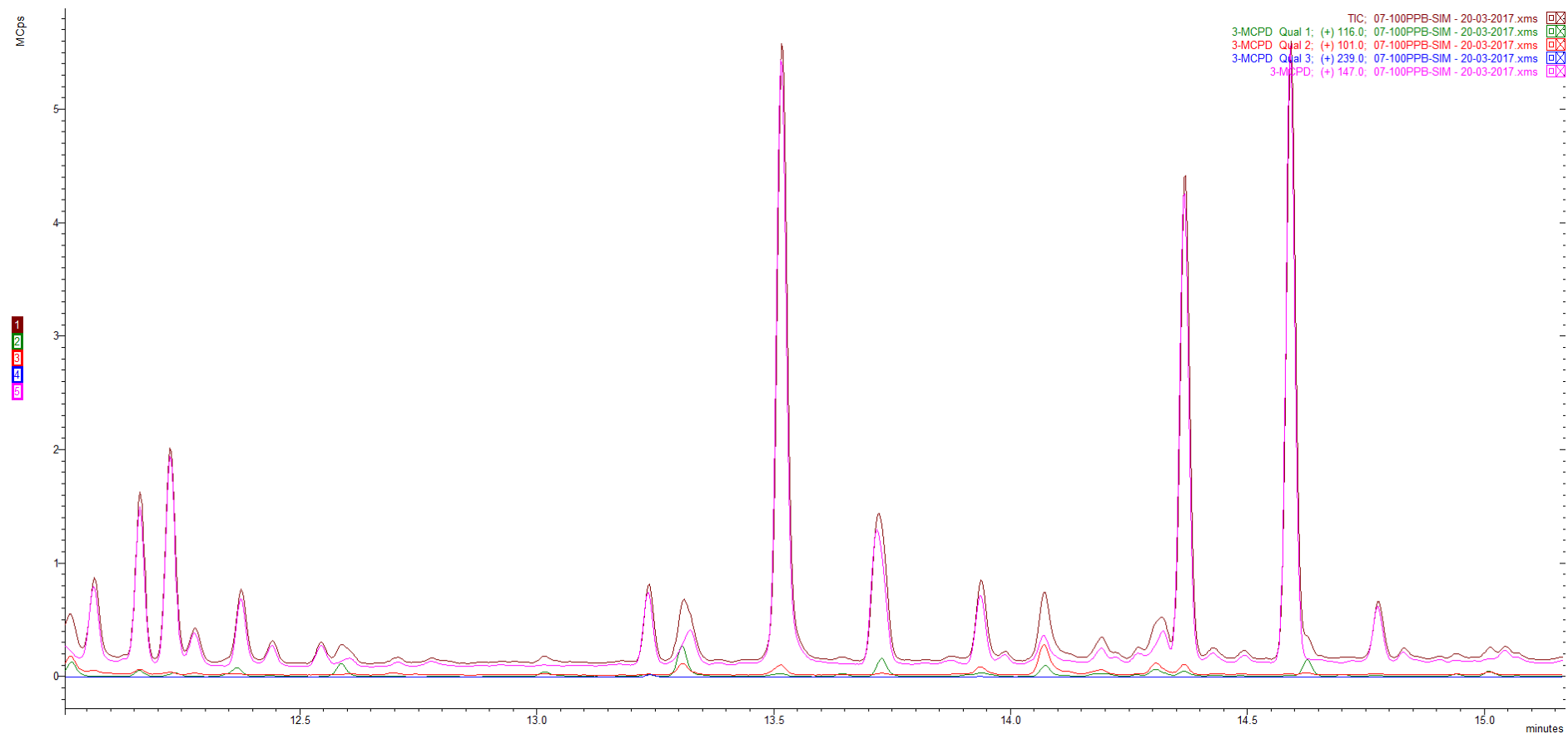


**Figura B 57- TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal -100 ppb**

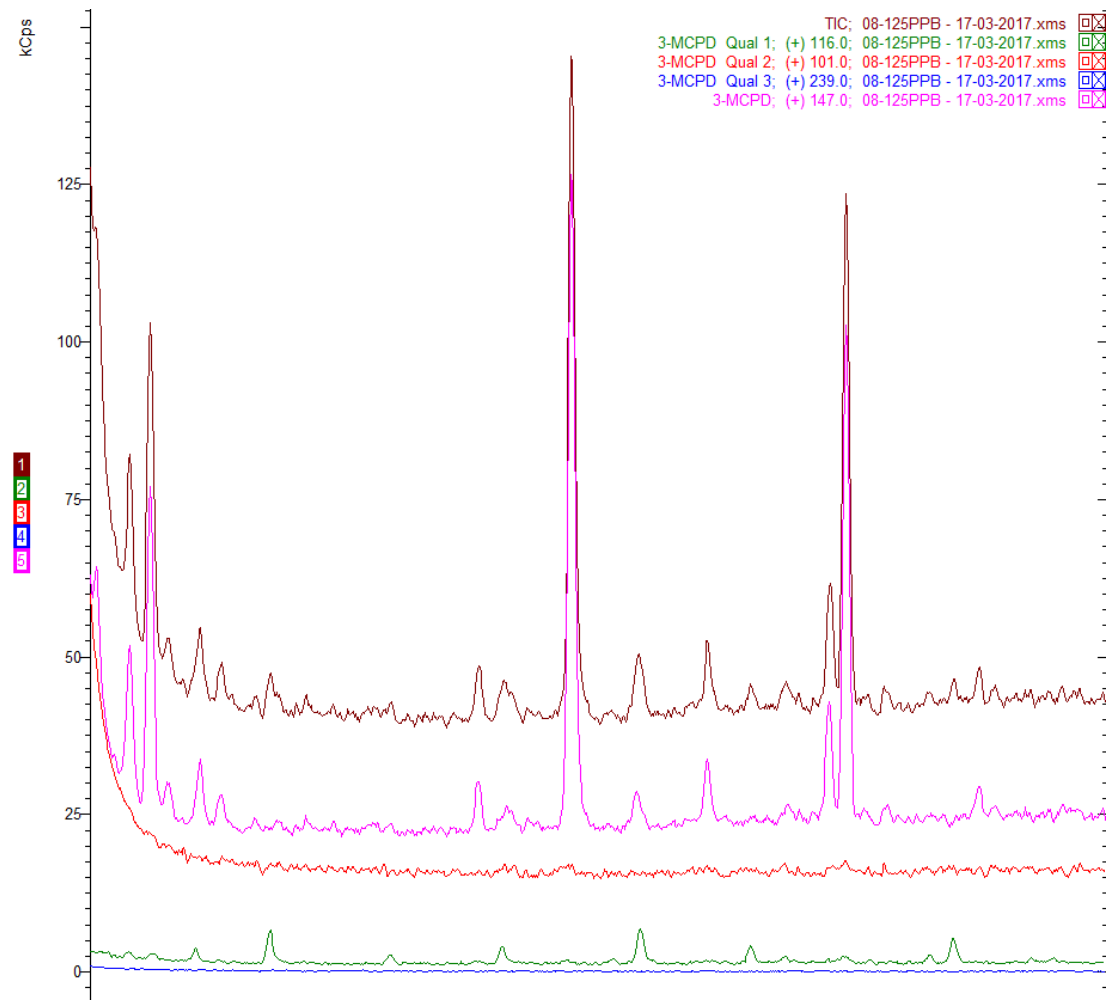


**Figura B 58-TIC da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 100 ppb- Modo SIM**





**Figura B 59- Cromatografia da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 100 ppb- Modo SIM para vários iões**



**Figura B 60- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 125 ppb para vários iões**

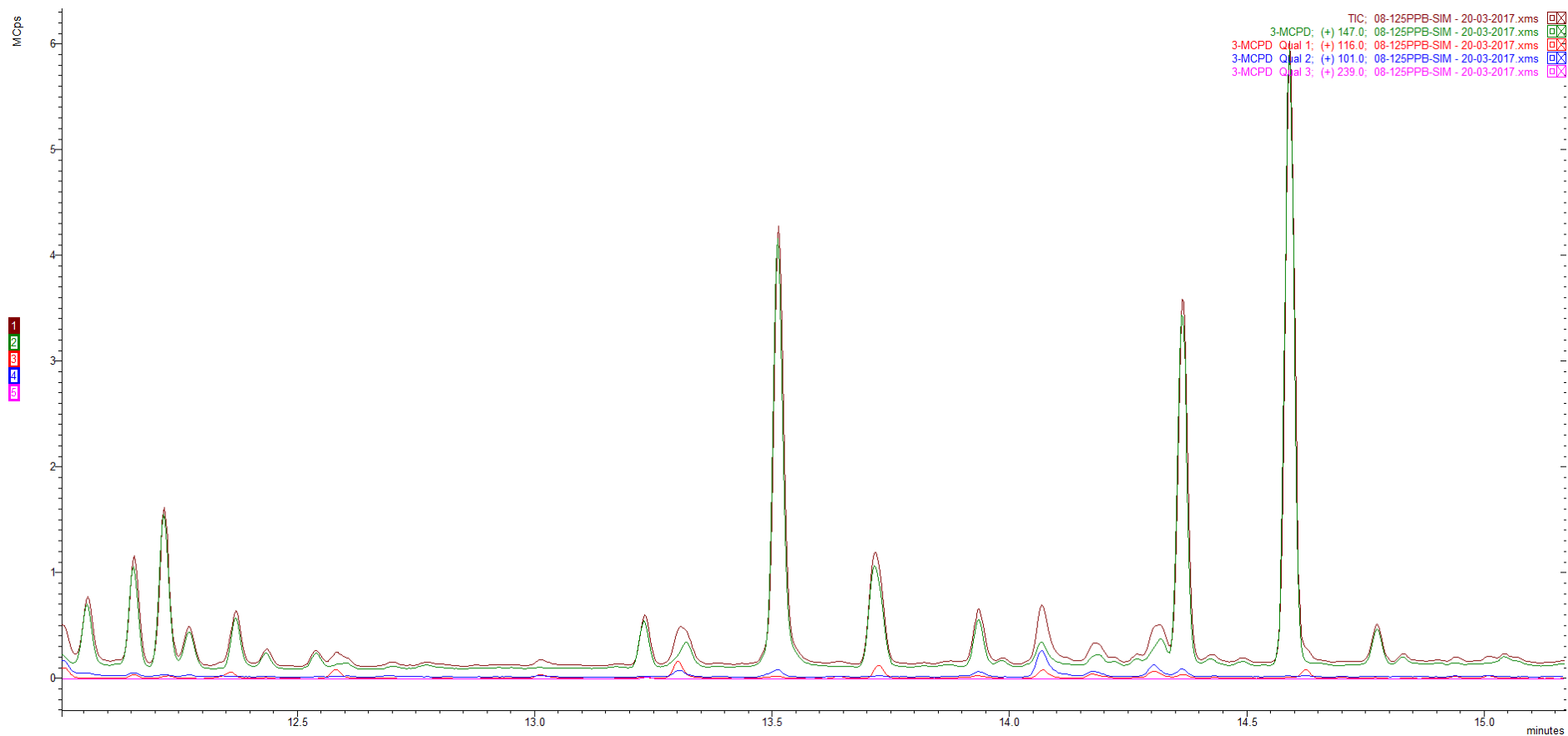
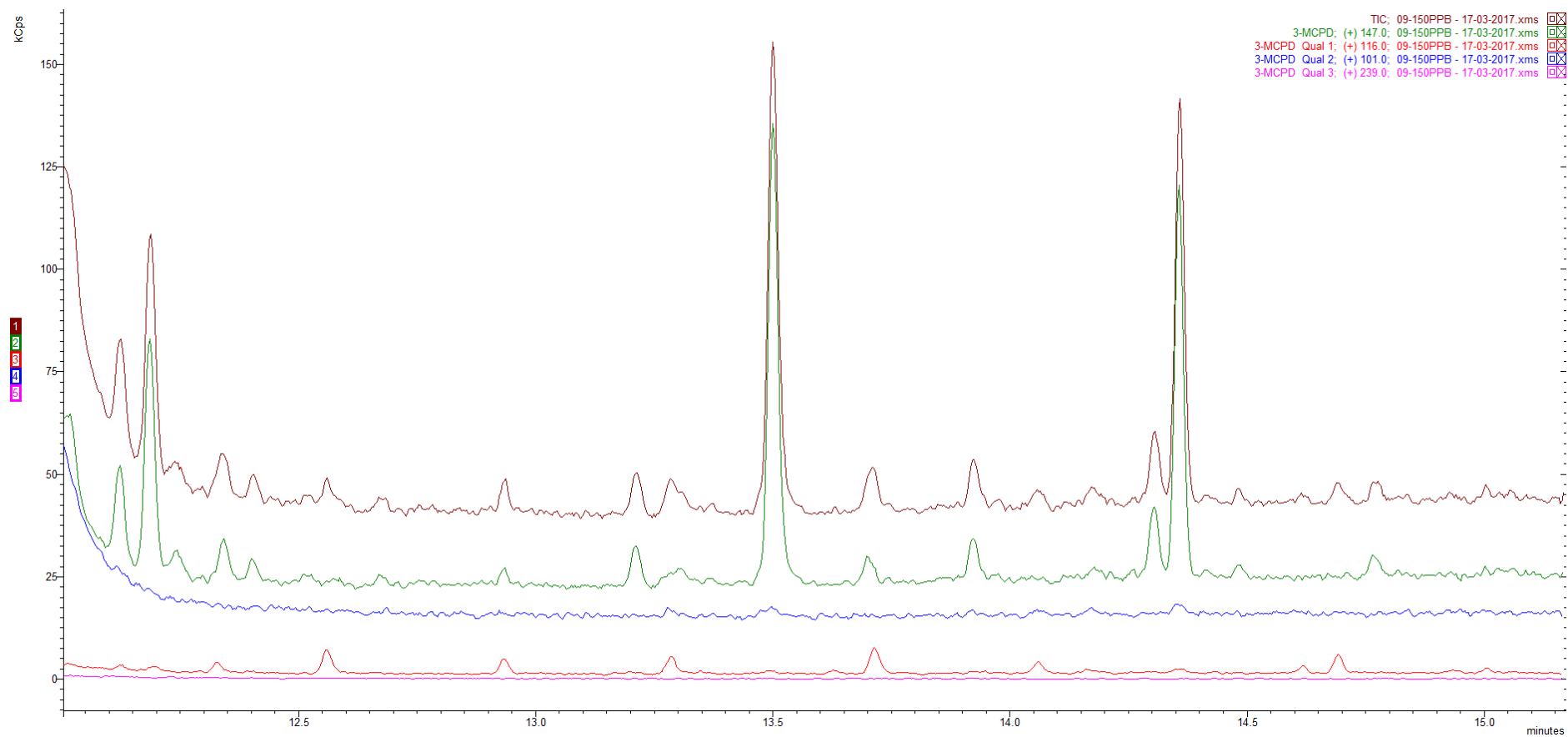
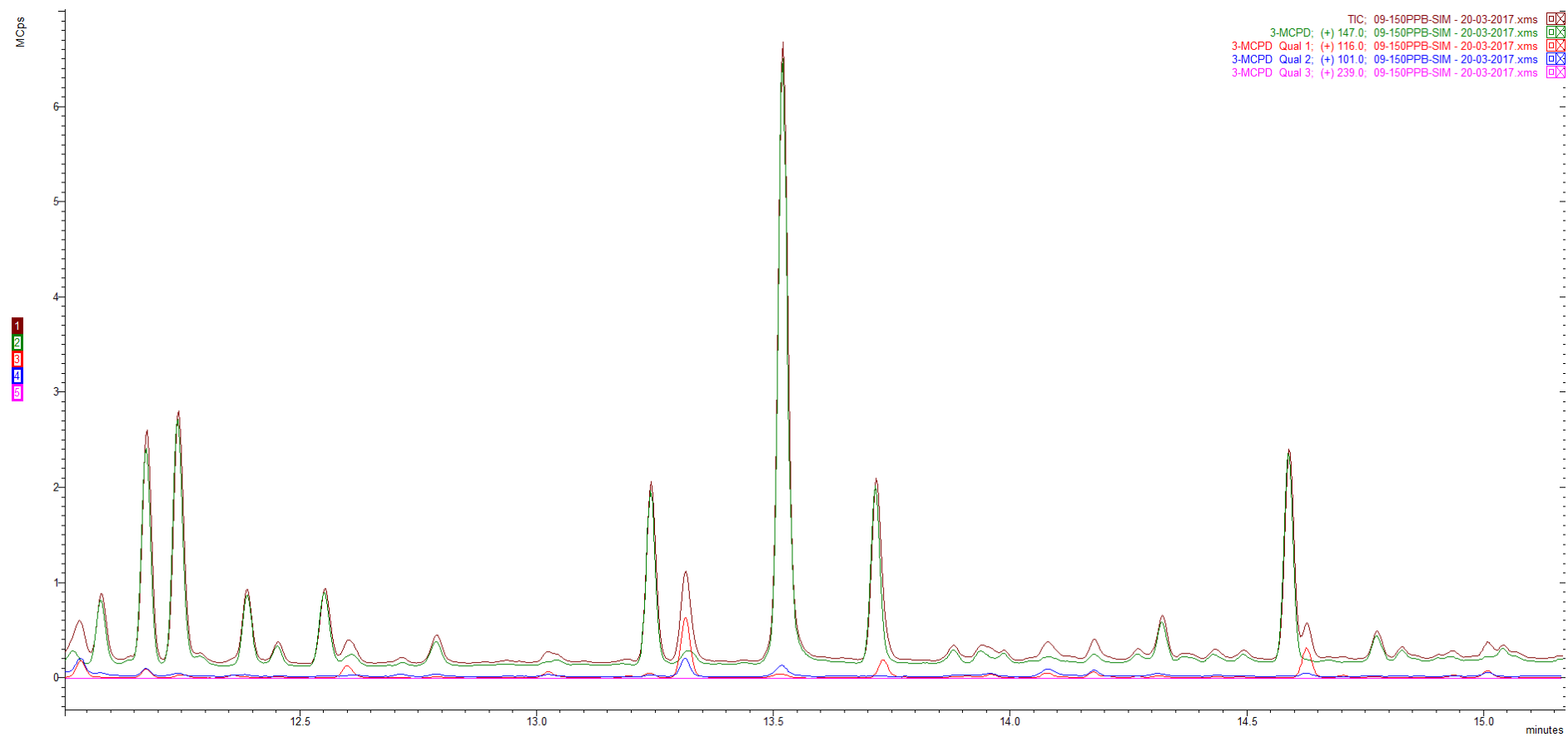


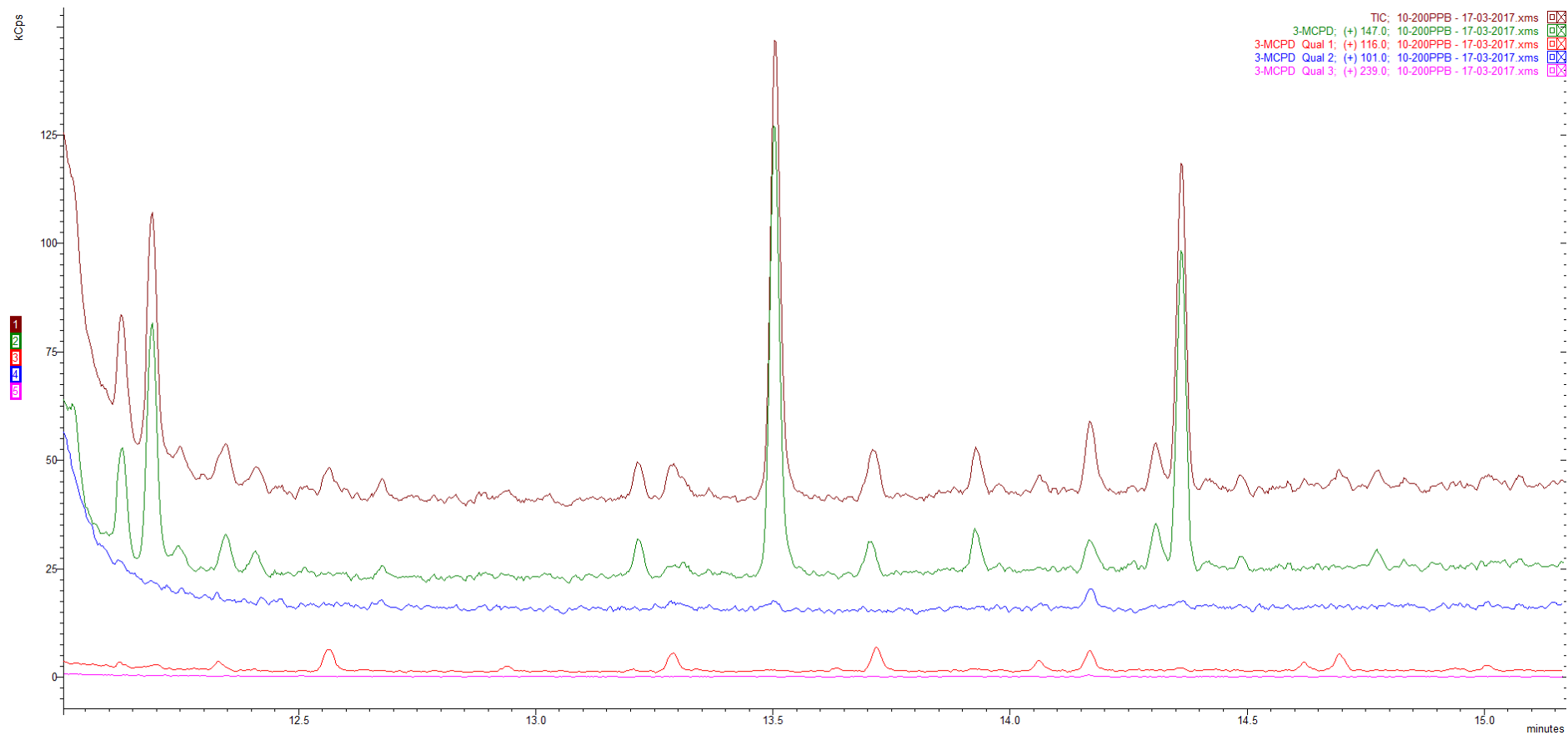
Figura B 61- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 125 ppb em Modo SIM para vários iões



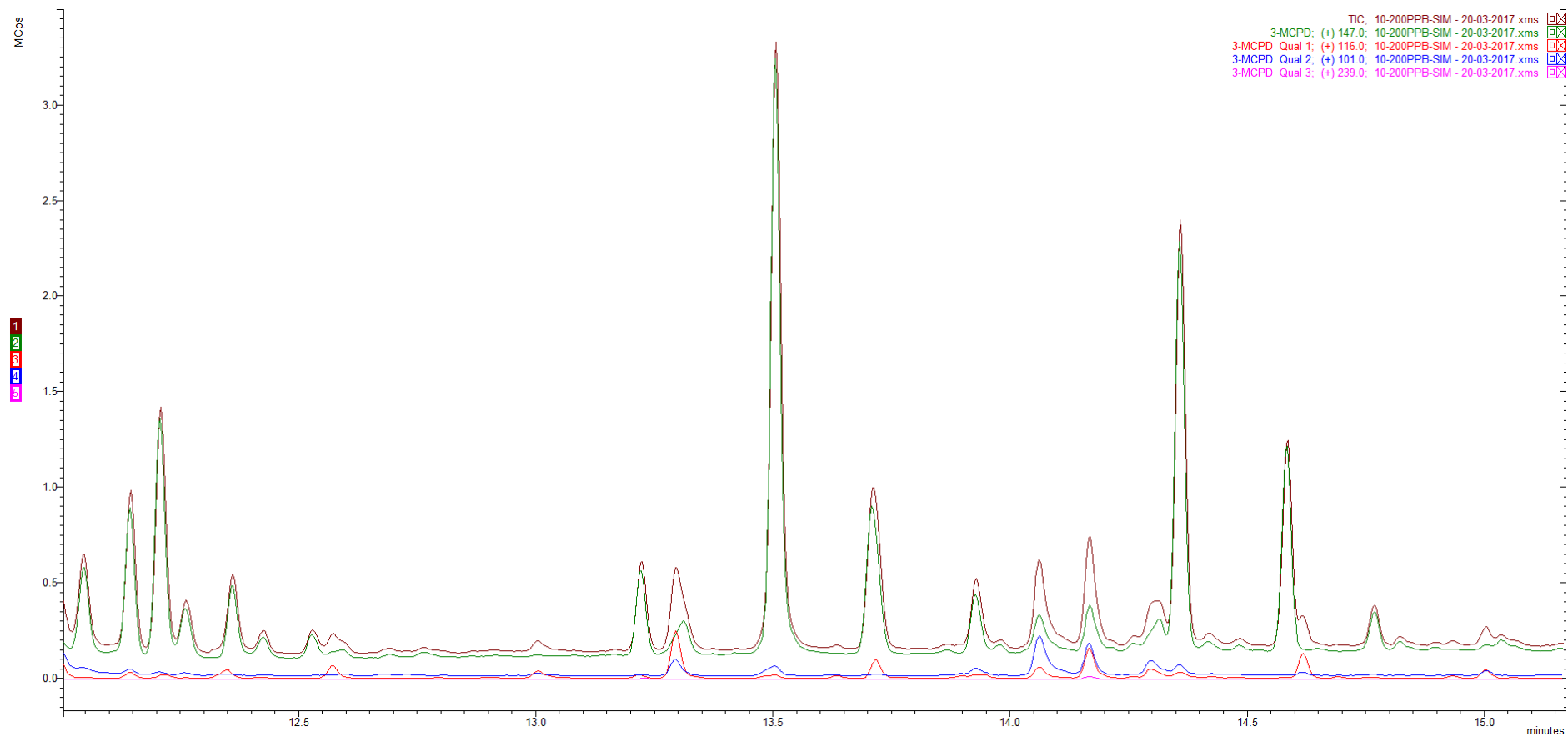
**Figura B 62-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 150 ppb para vários iões**



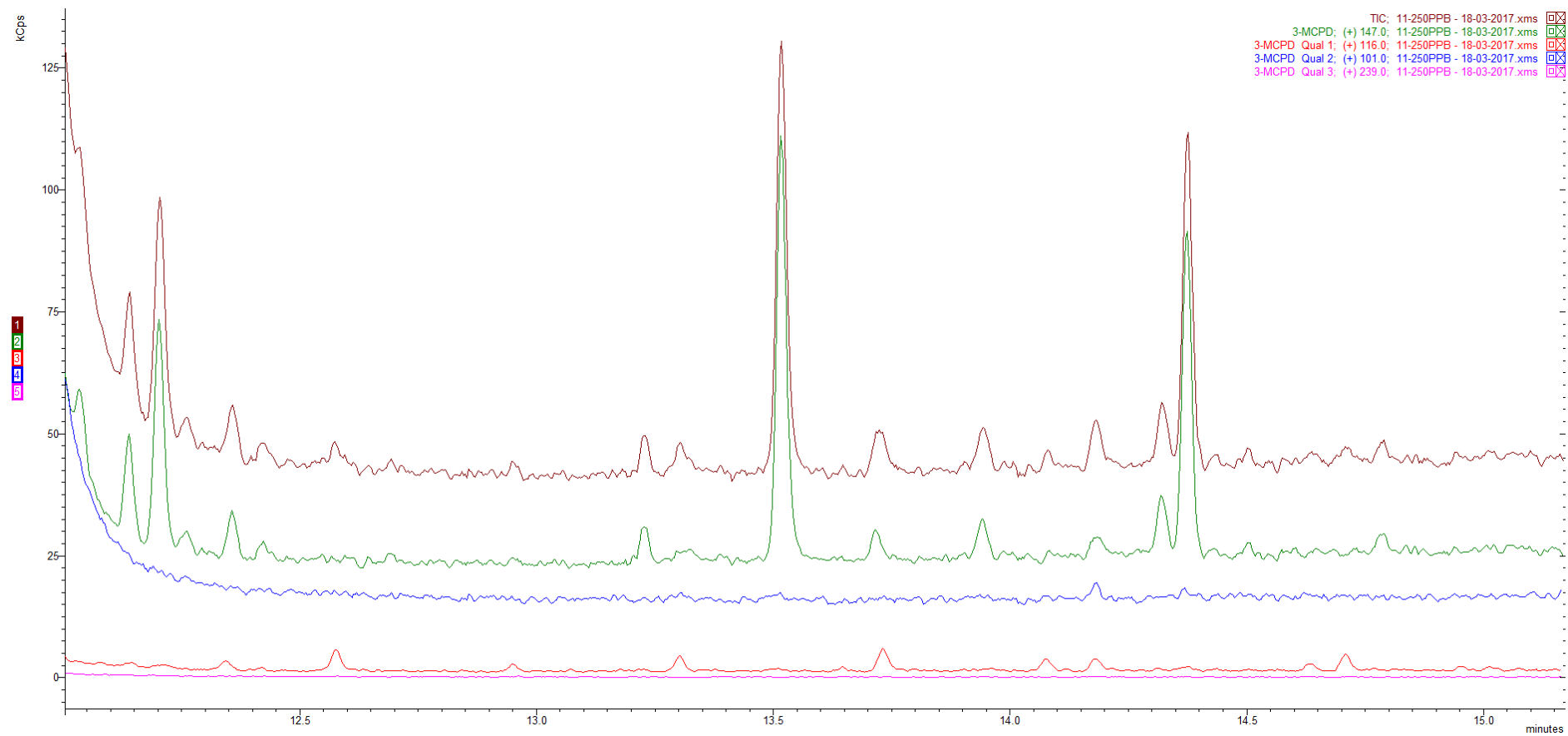
**Figura B 63 –Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 150 ppb em Modo SIM para vários iões**



**Figura B 64- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 200 ppb para vários iões**



**Figura B 65-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 200 ppb--Modo SIM para vários iões**



**Figura B 66- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 250 ppb- para vários iões**



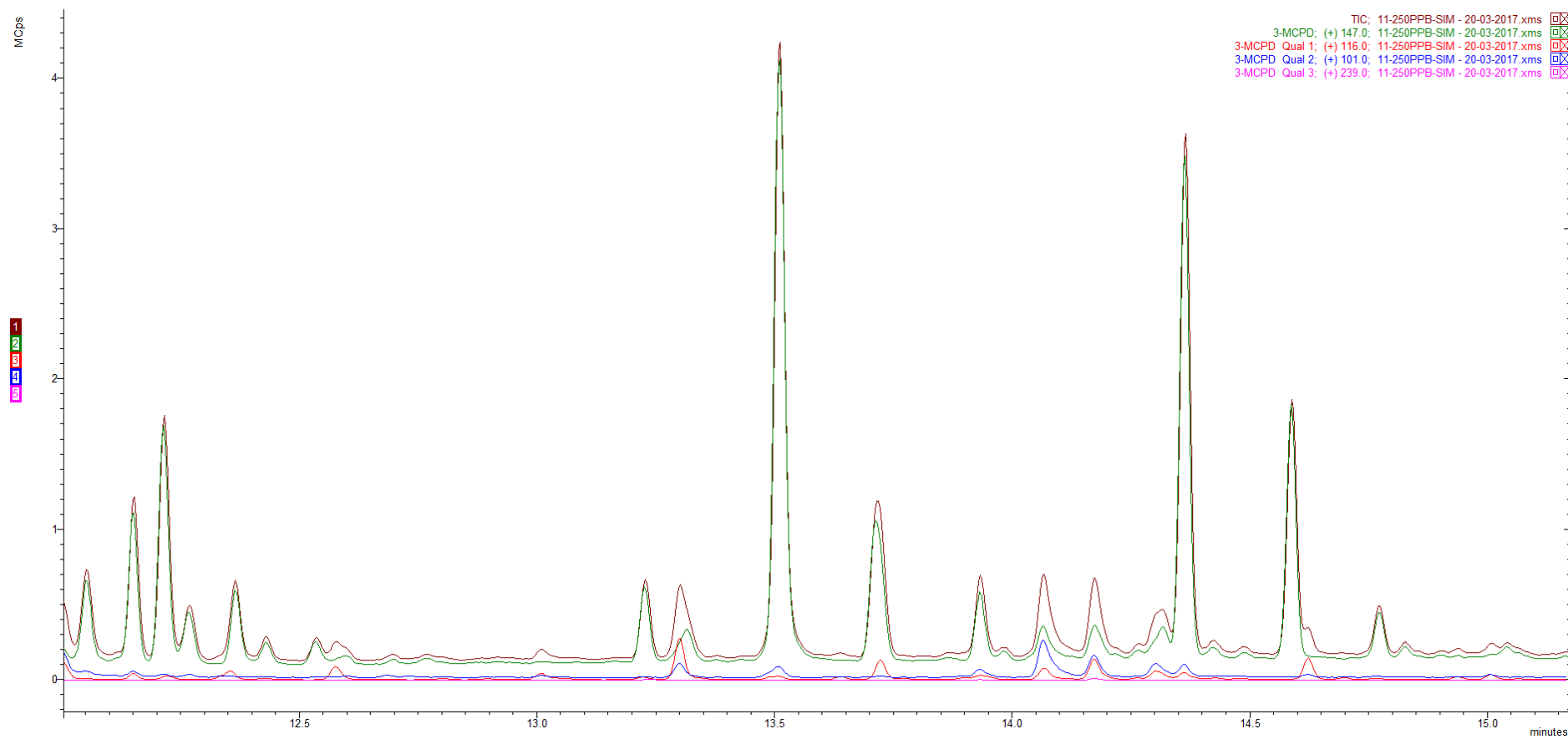
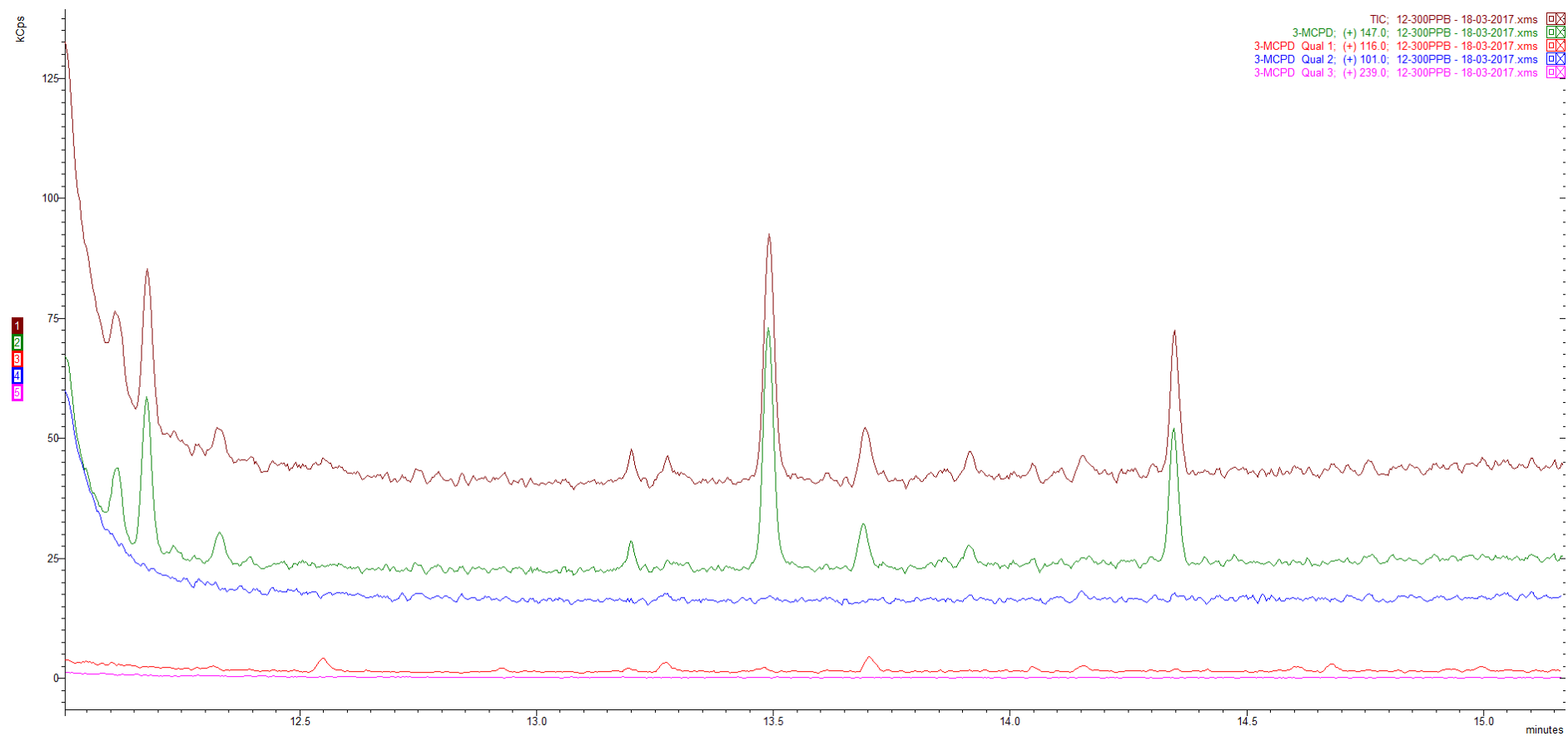
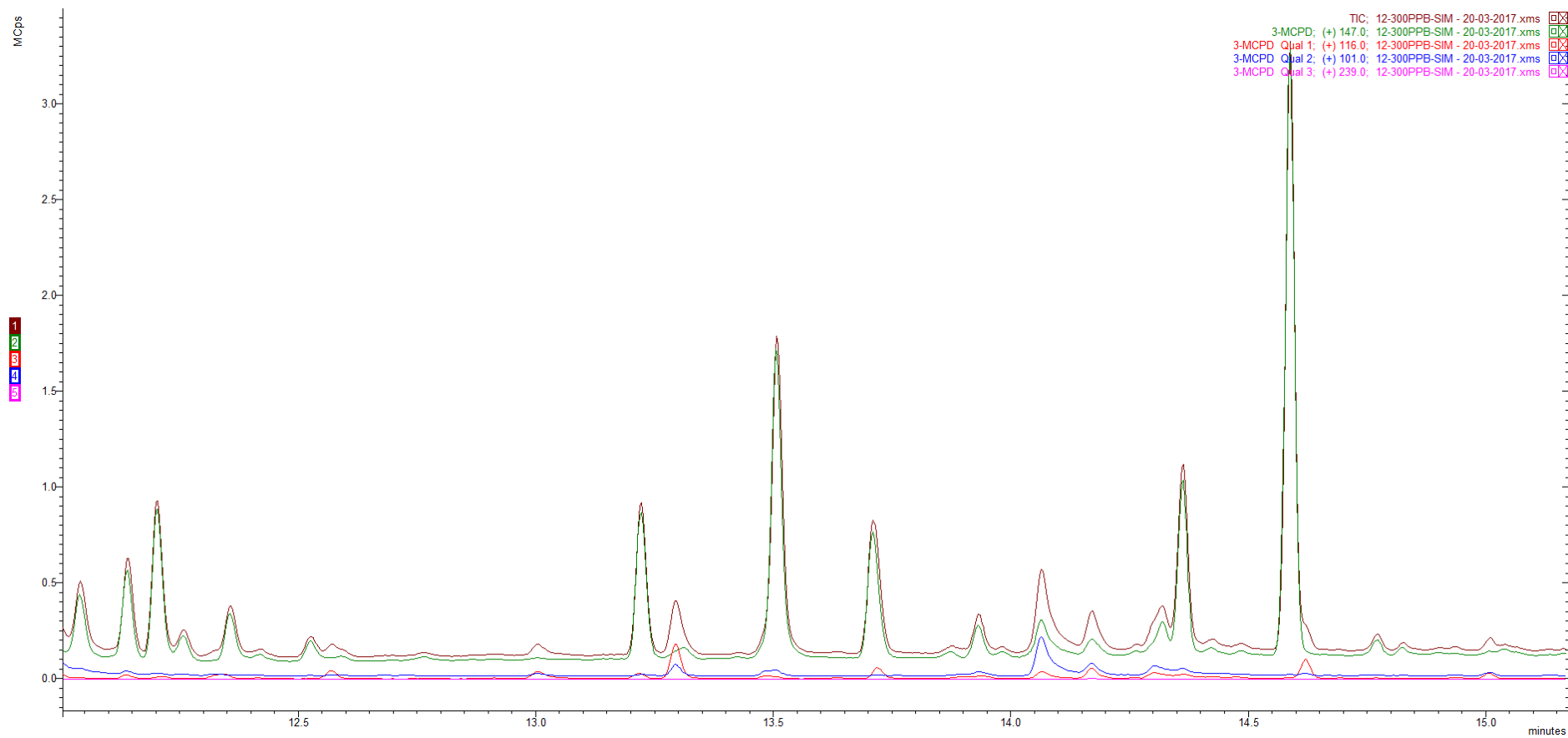


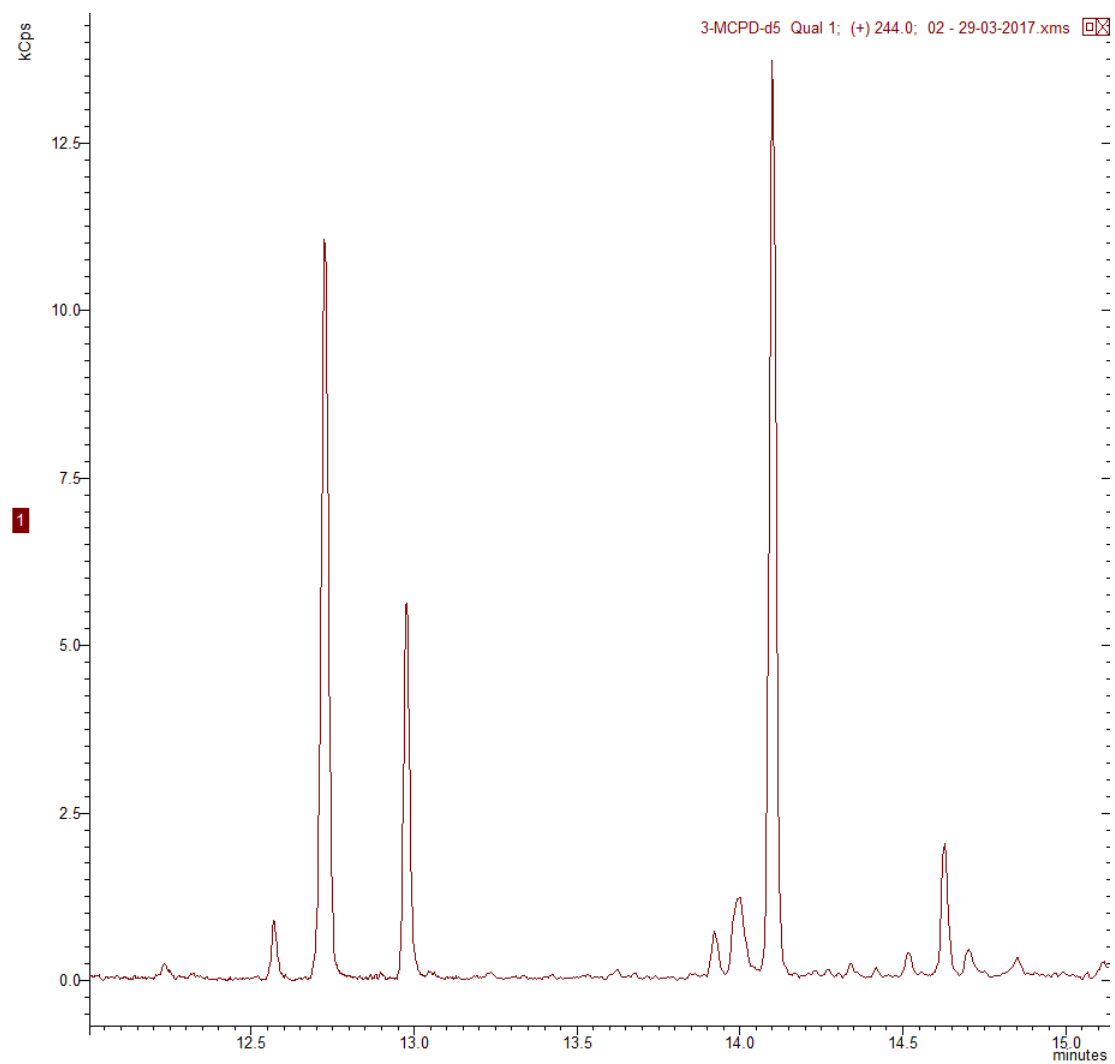
Figura B 67- Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 250 ppb Modo SIM para vários iões



**Figura B 68- Cromatograma da sobreposição da Derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal a 300 ppb- para vários iões**



**Figura B 69-Cromatograma da sobreposição da derivatização com BSTFA: Elaboração da curva normal- 300 ppb Modo SIM para vários iões**



**Figura B 70- Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com Cloro- ião 244**

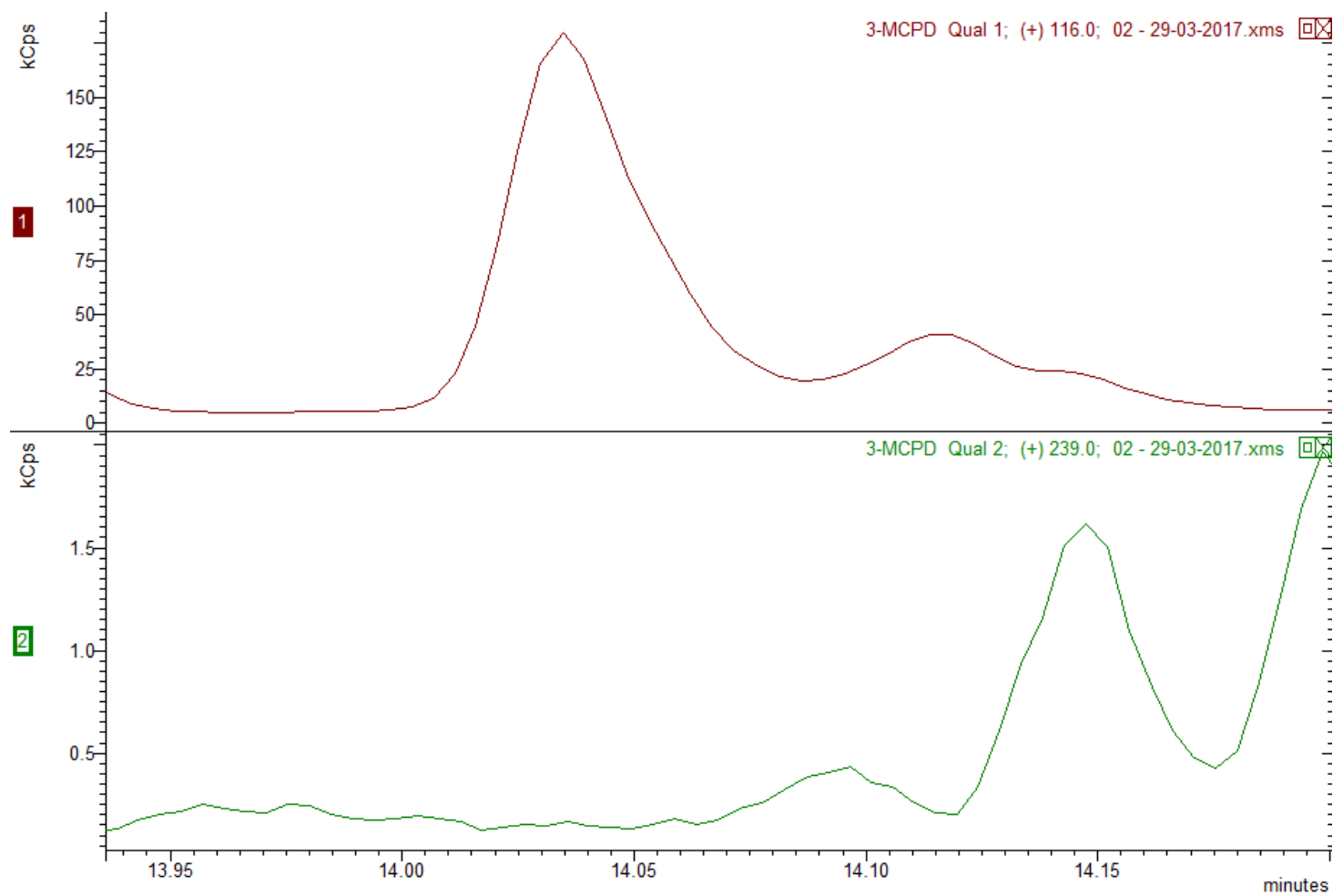


Figura B 71- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com Cloro- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

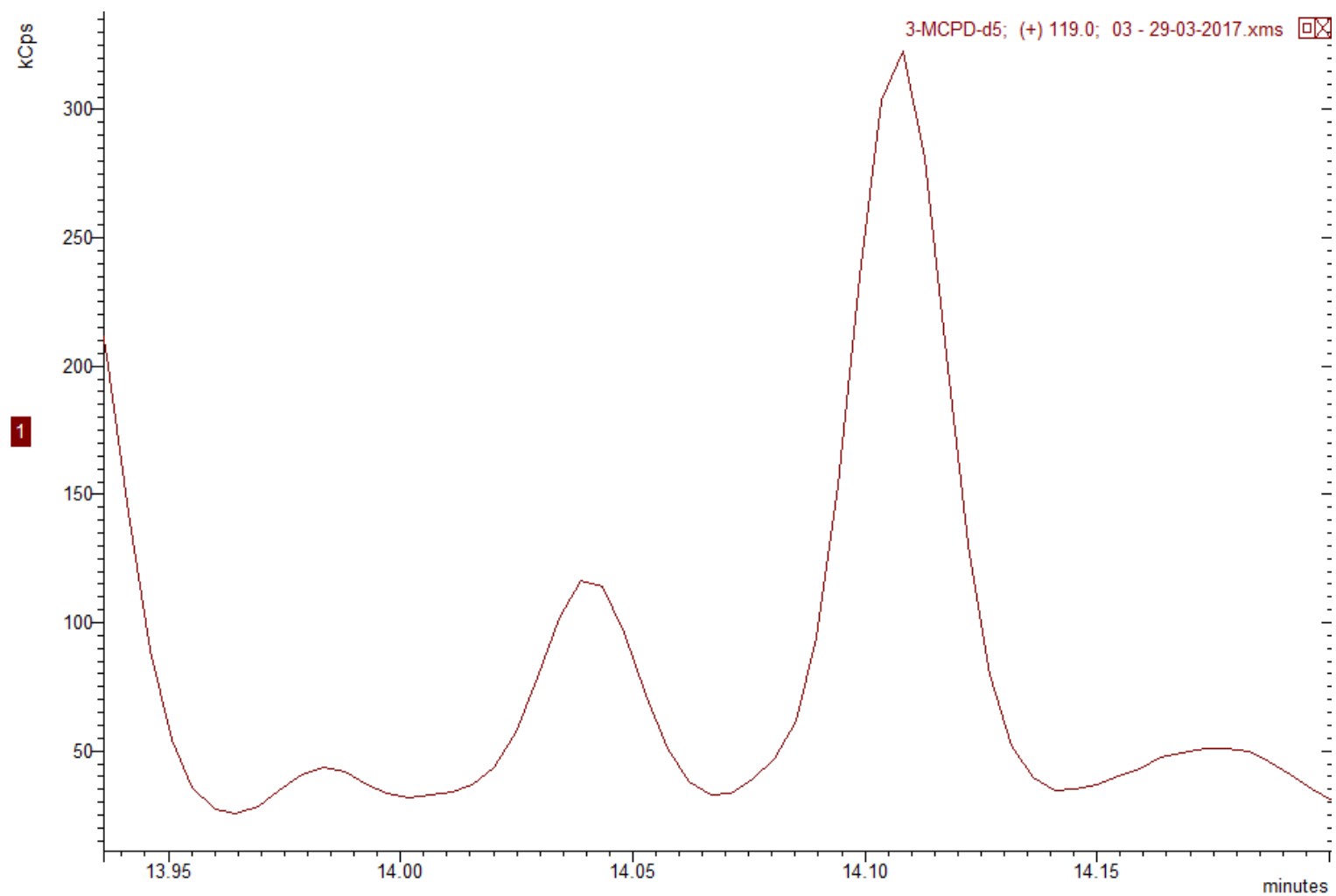


Figura B 72-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem óleo de palma- ião 119

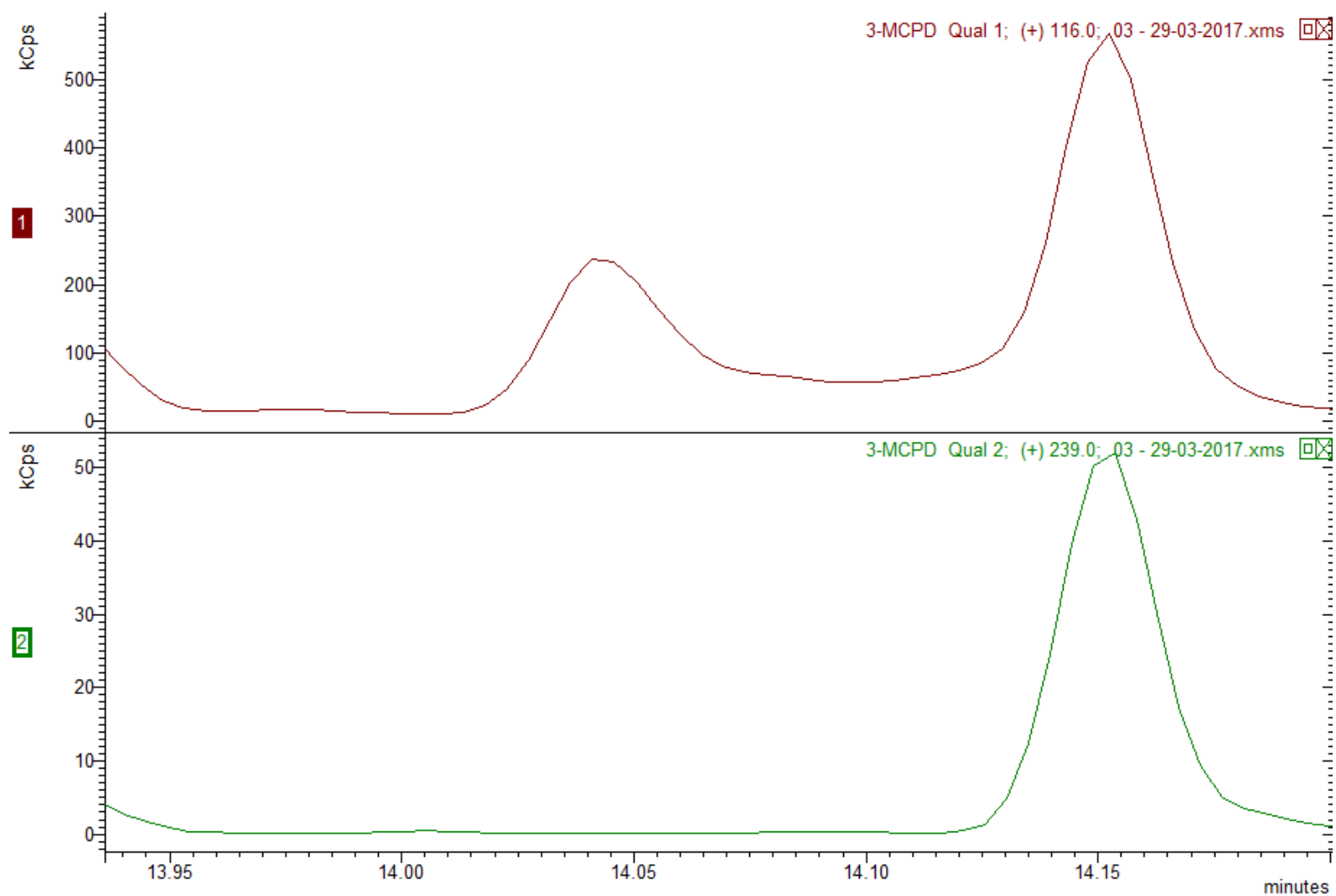


Figura B 73-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem óleo de palma- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

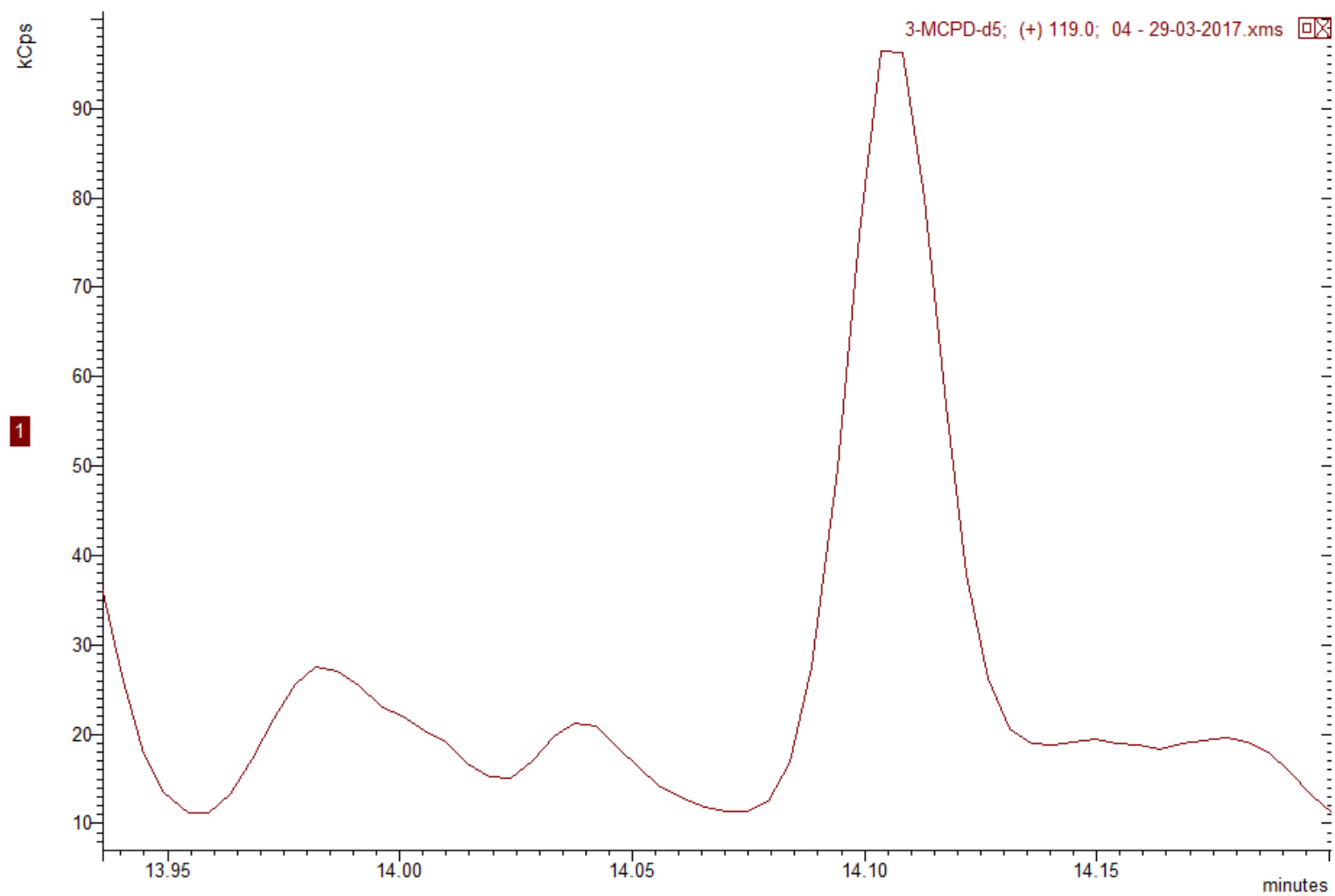


Figura B 74-Figura B 72-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem colco mono- ião 119



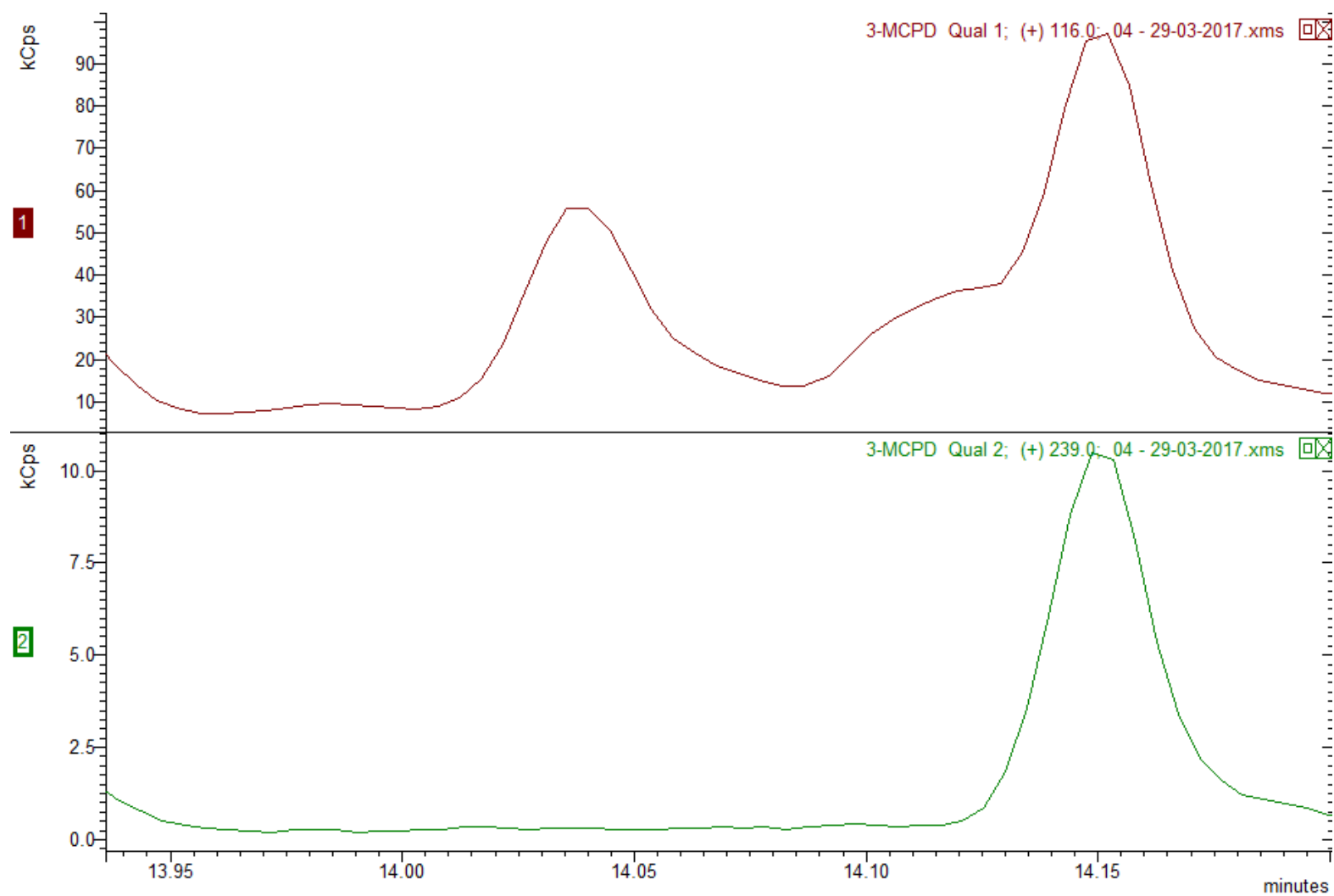


Figura B 75-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem colco mono - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

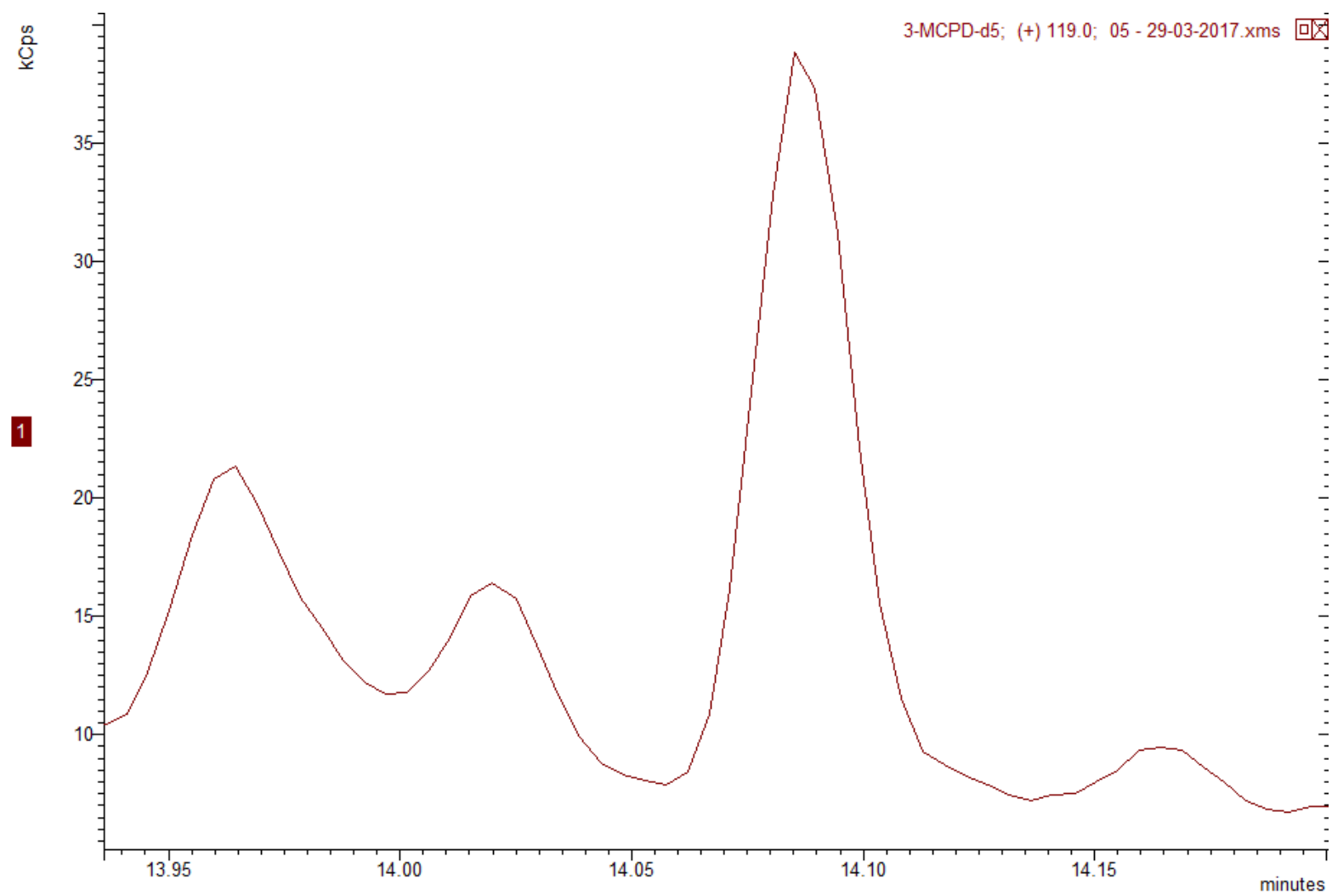


Figura B 76-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem aroma de Limão- ião 119

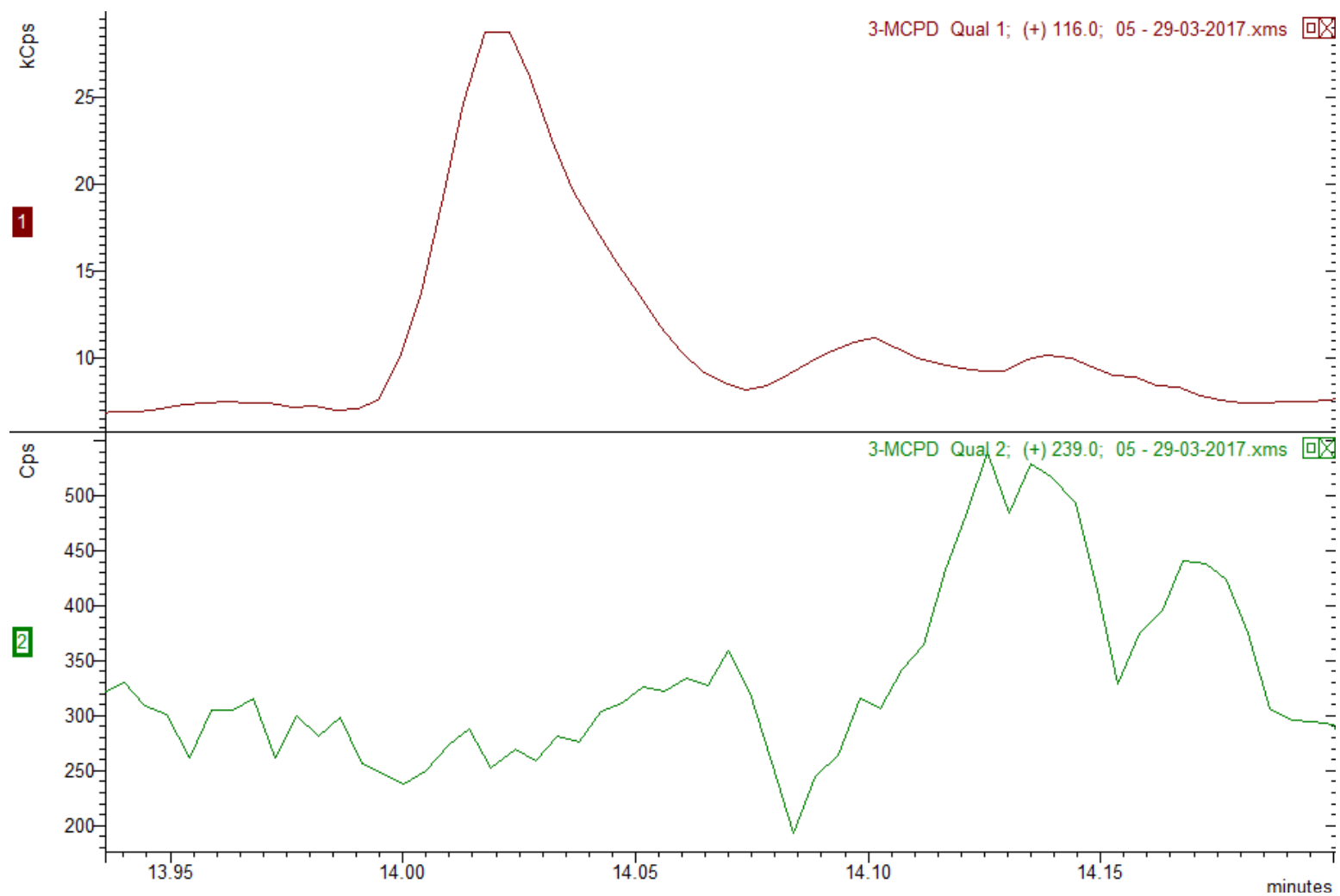


Figura B 77-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem aroma de limão - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

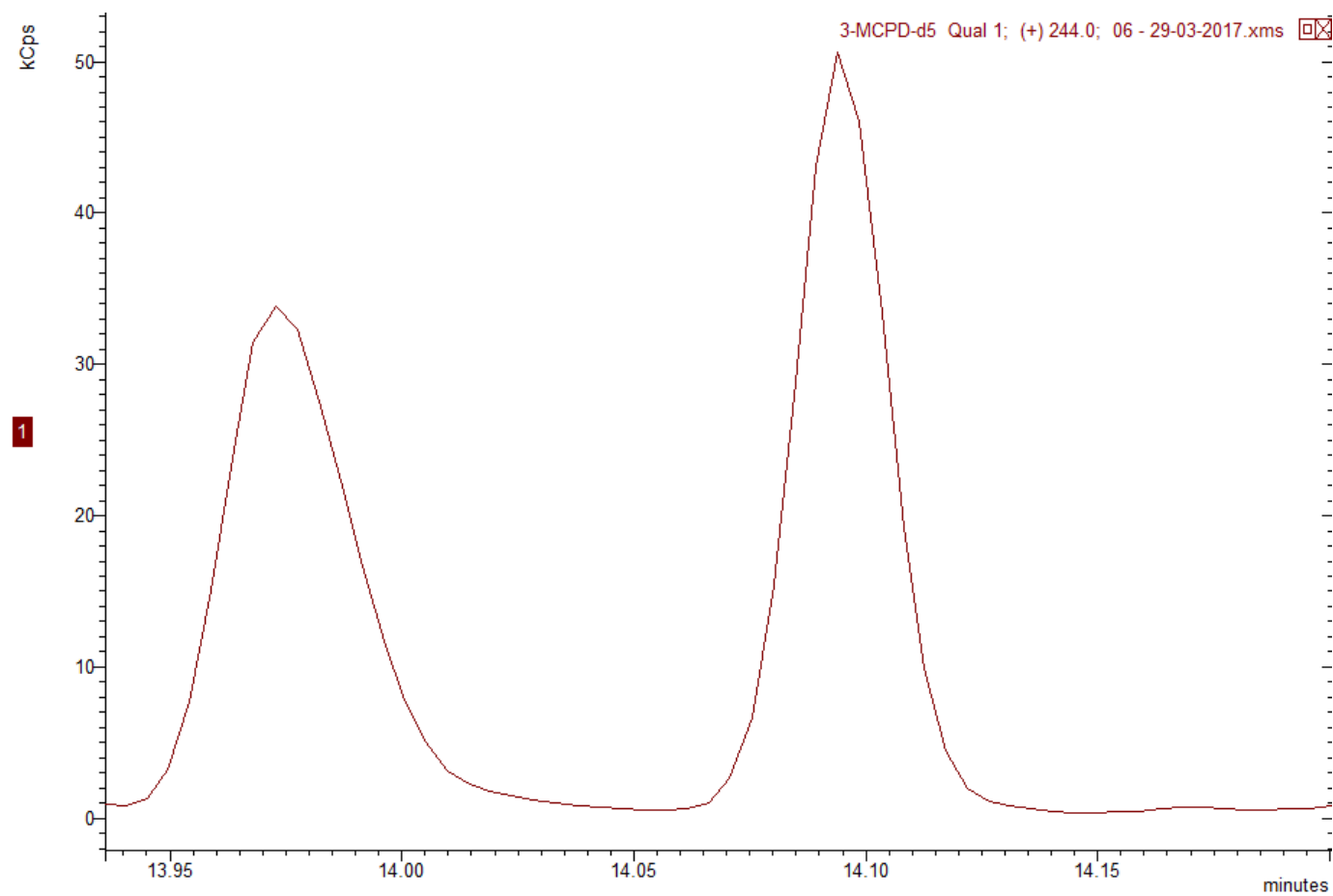


Figura B 78-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com água destilada- ião 244

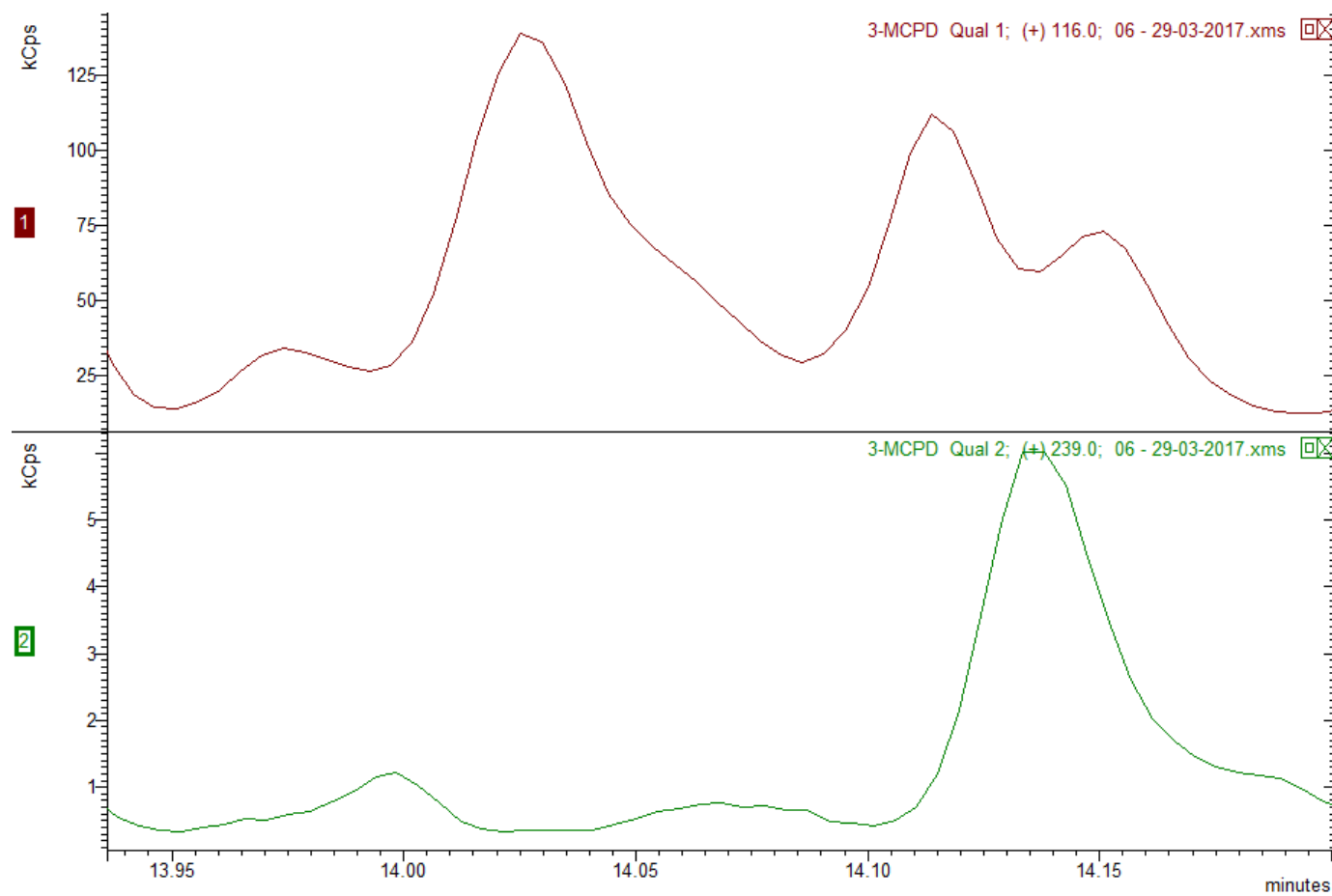


Figura B 79-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com água destilada- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

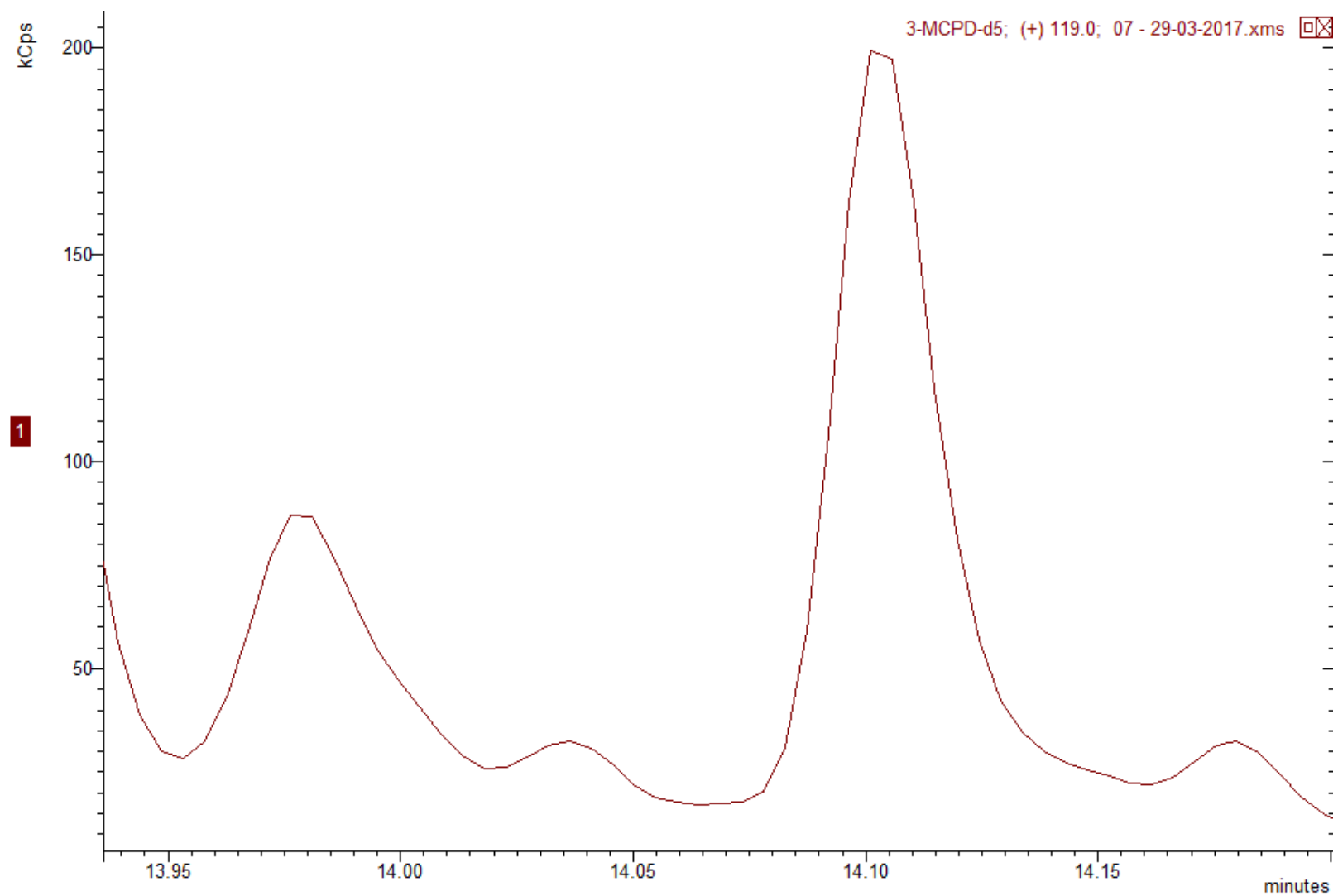


Figura B 80-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com triplo do limão em pó- ião 119

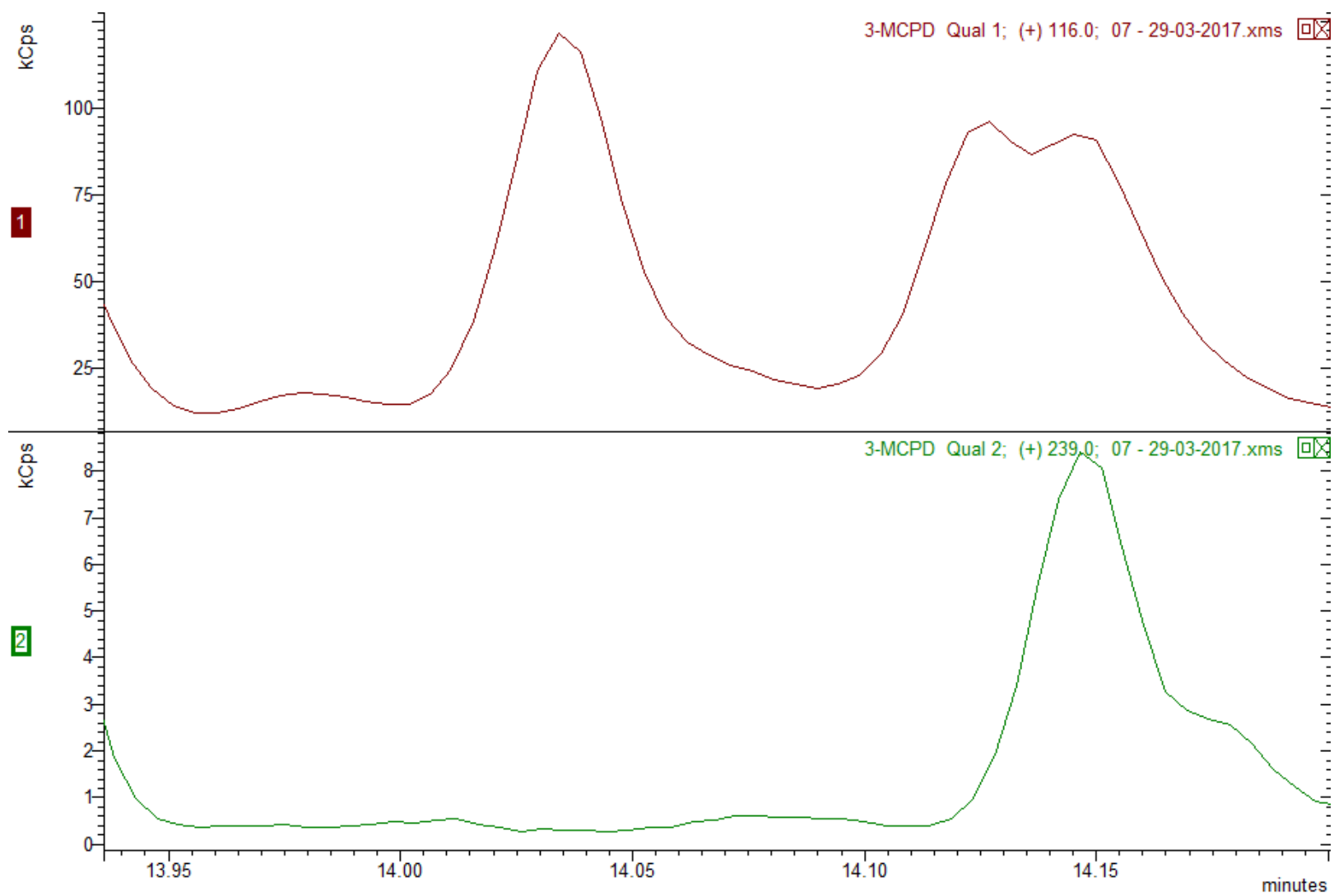


Figura B 81-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com triplo do Limão em pó - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

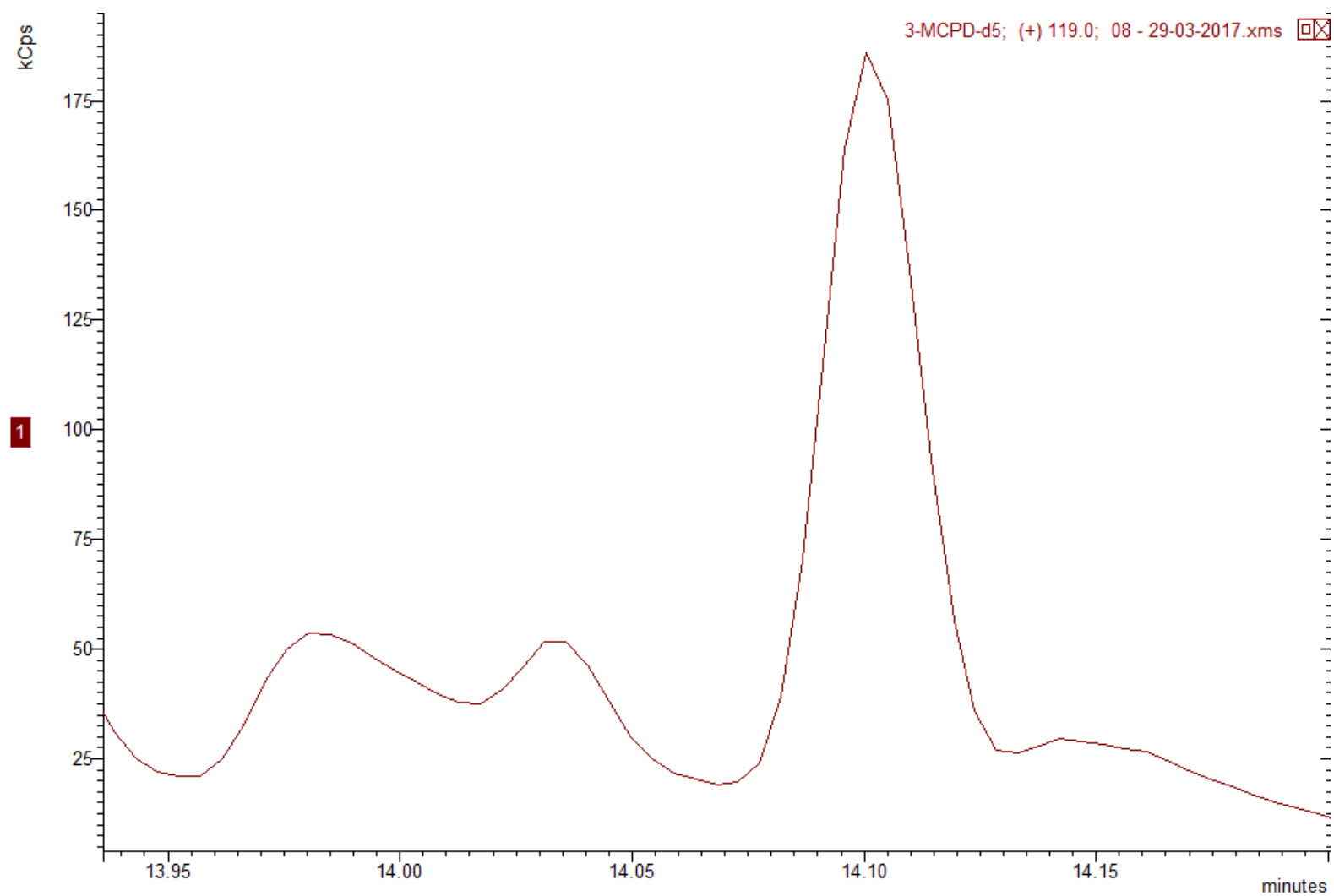


Figura B 82-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com mínimo do óleo desmoldante - ião 119



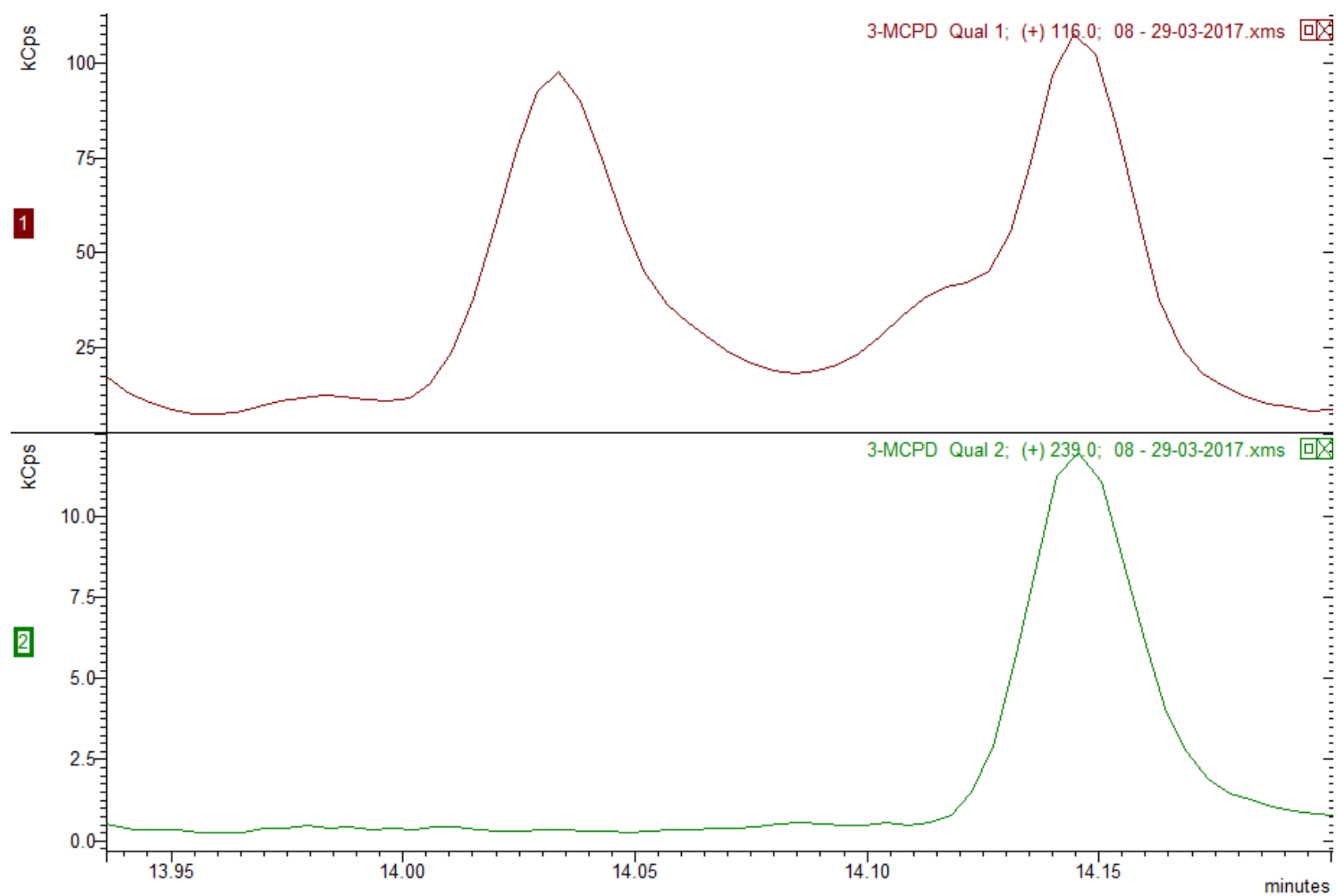


Figura B 83-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com mínimo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

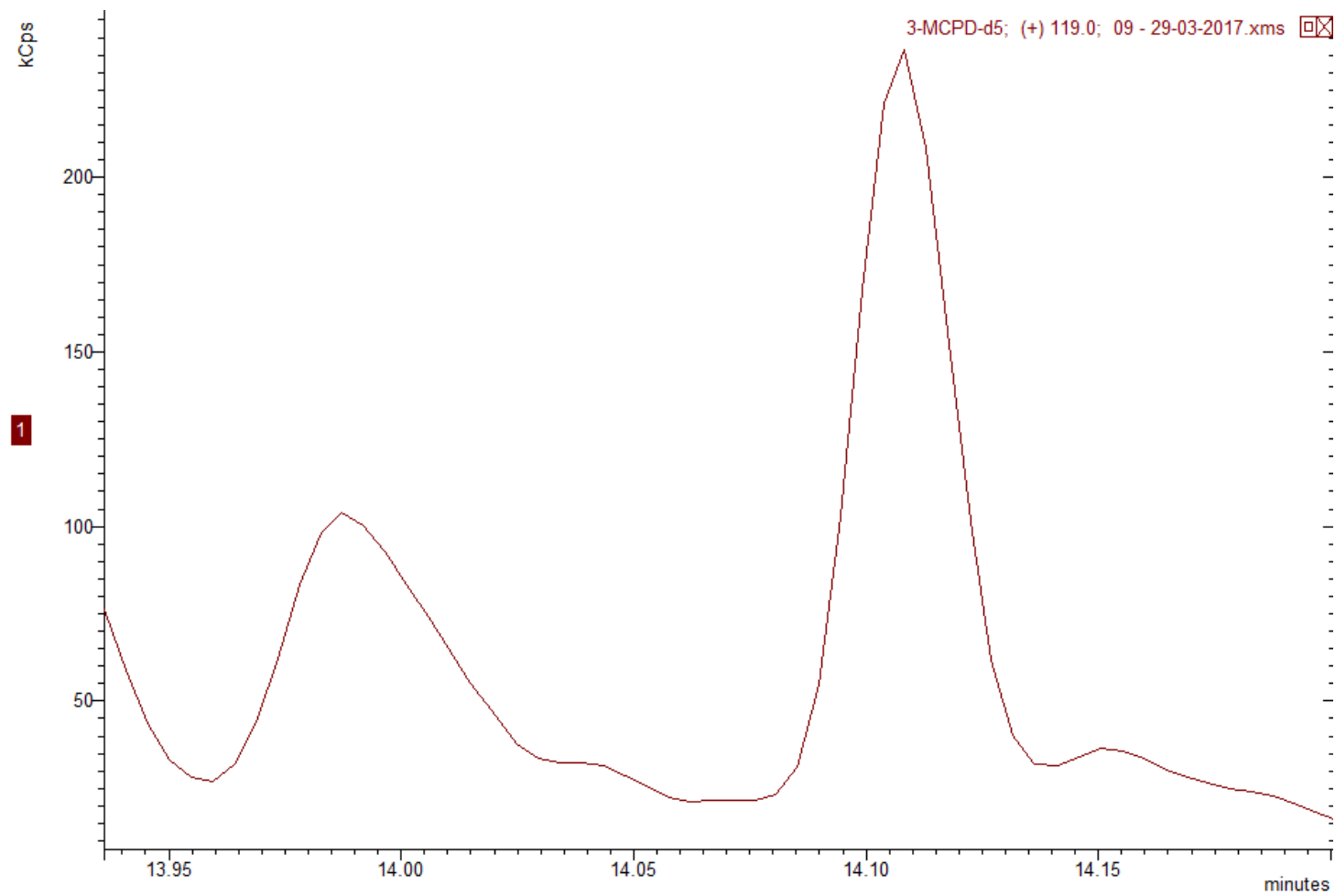


Figura B 84-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com triplo do óleo desmoldante - ião 119

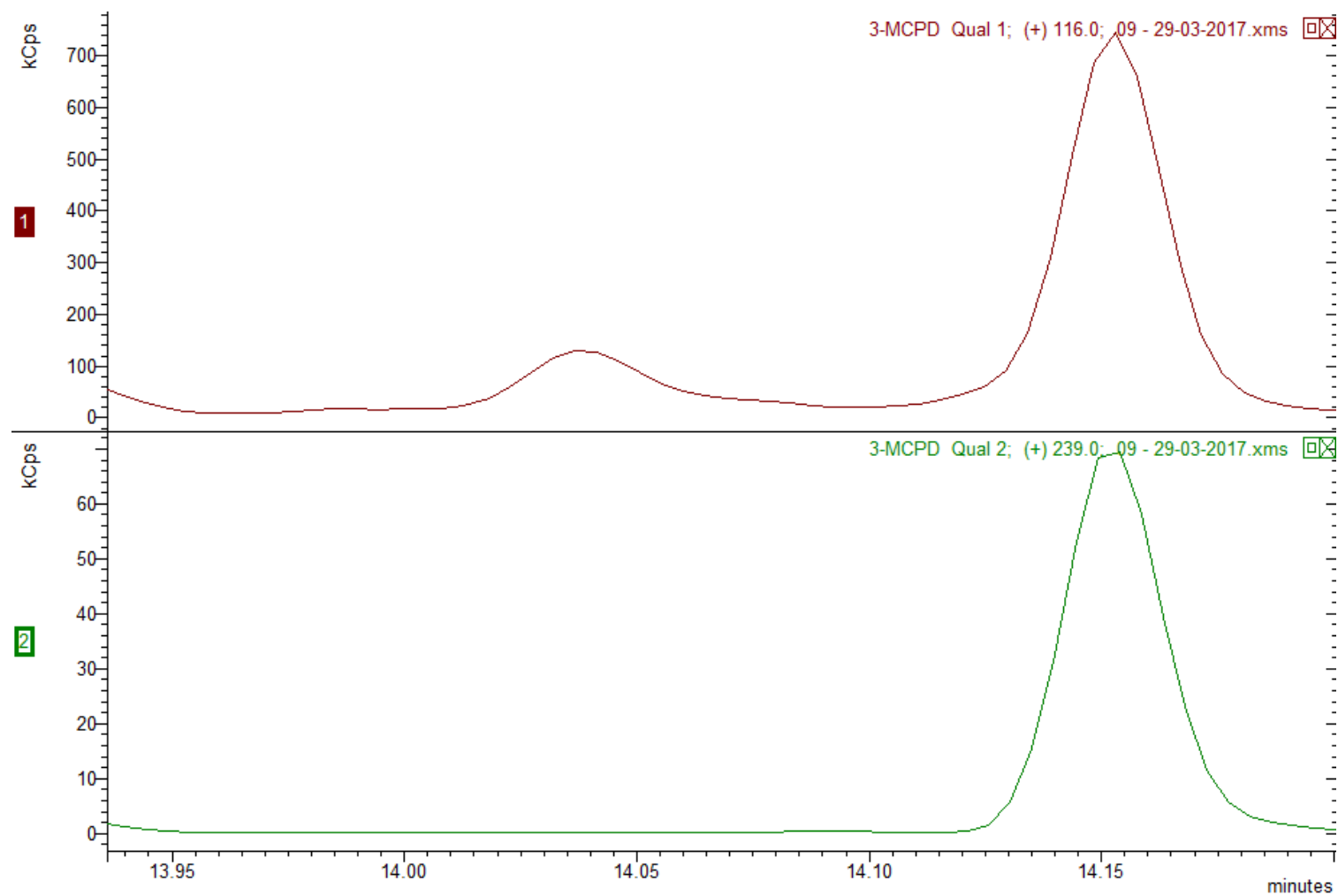


Figura B 85-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com triplo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

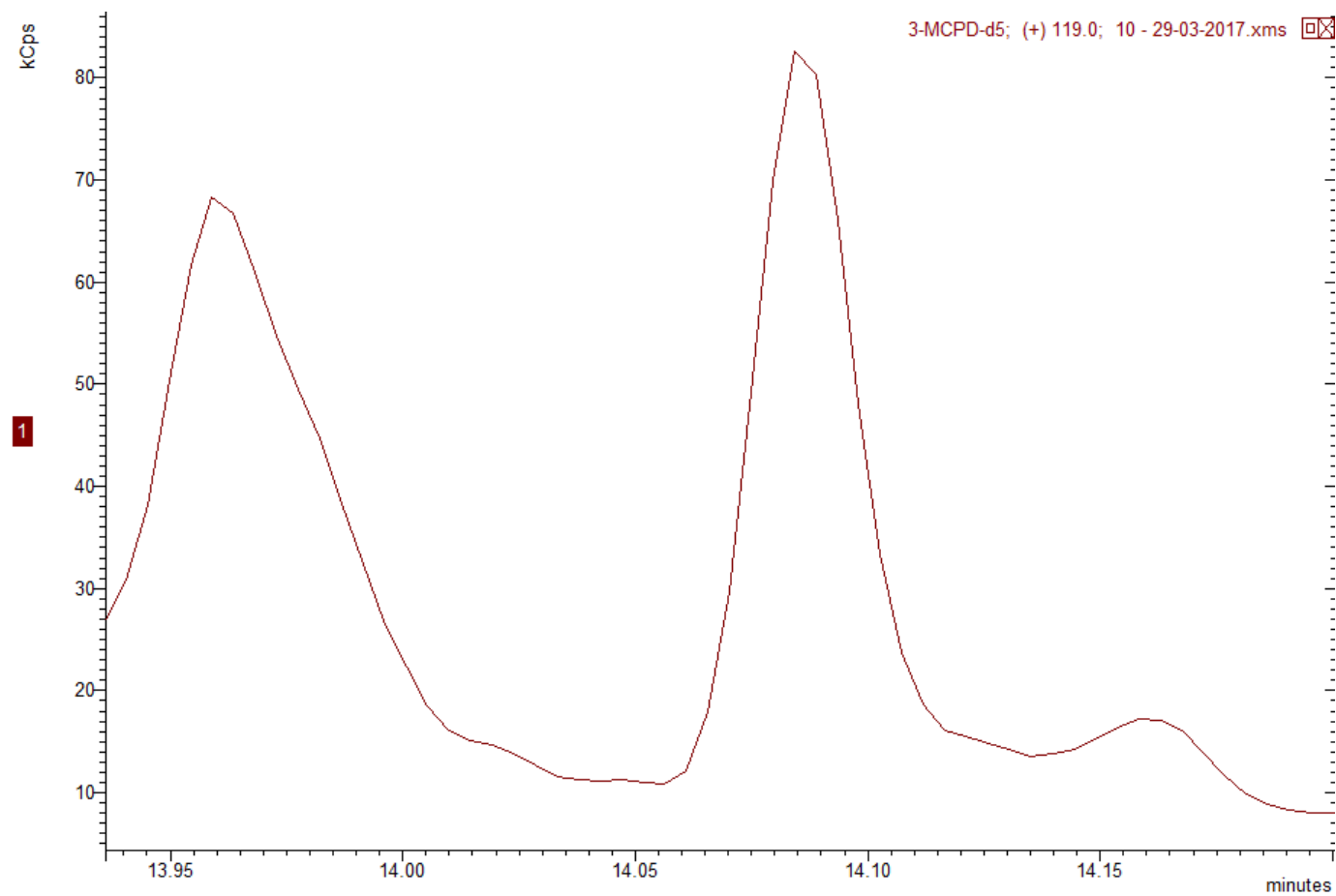


Figura B 86-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão sem glicerina - ião 119

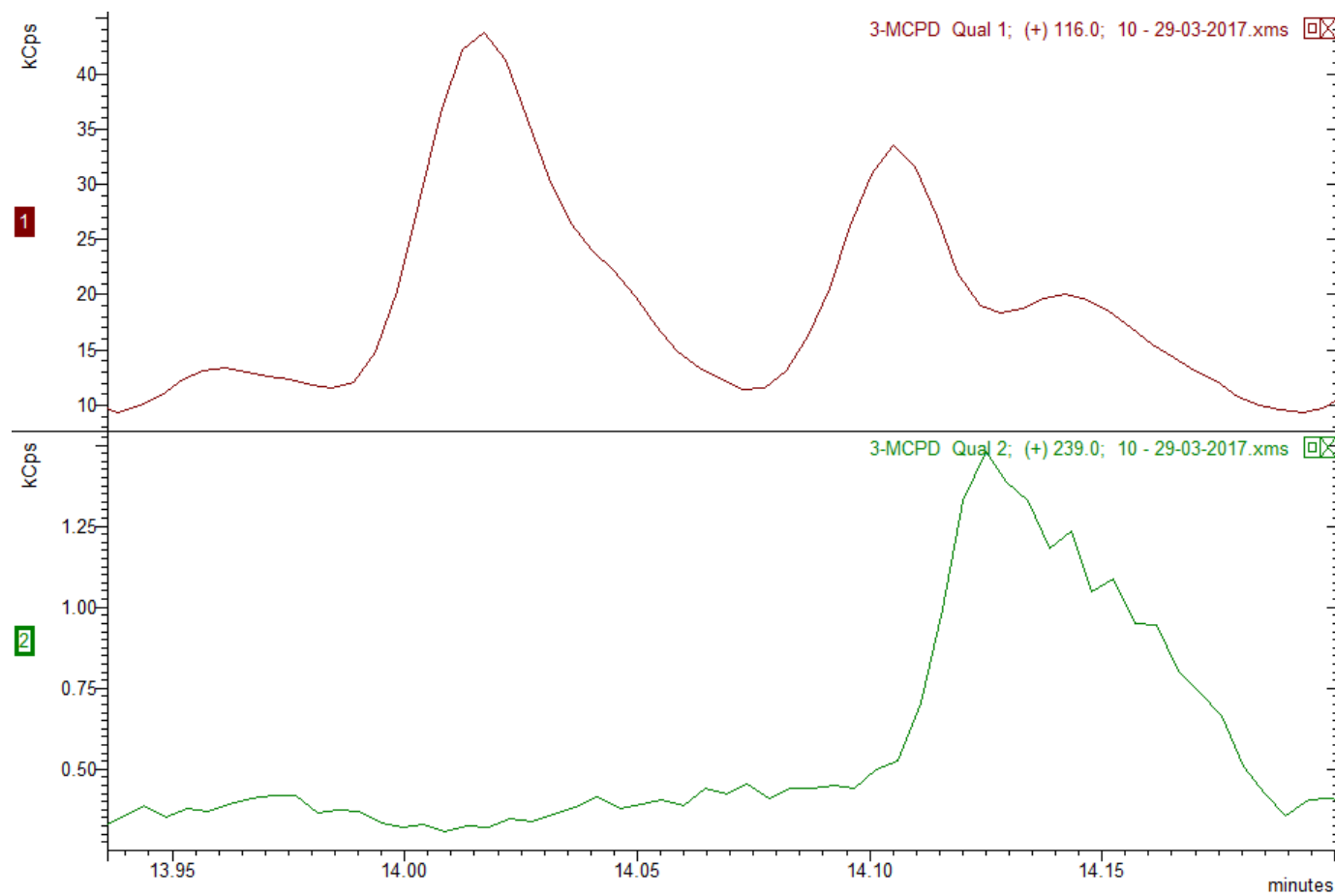


Figura B 87-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão sem glicerina - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

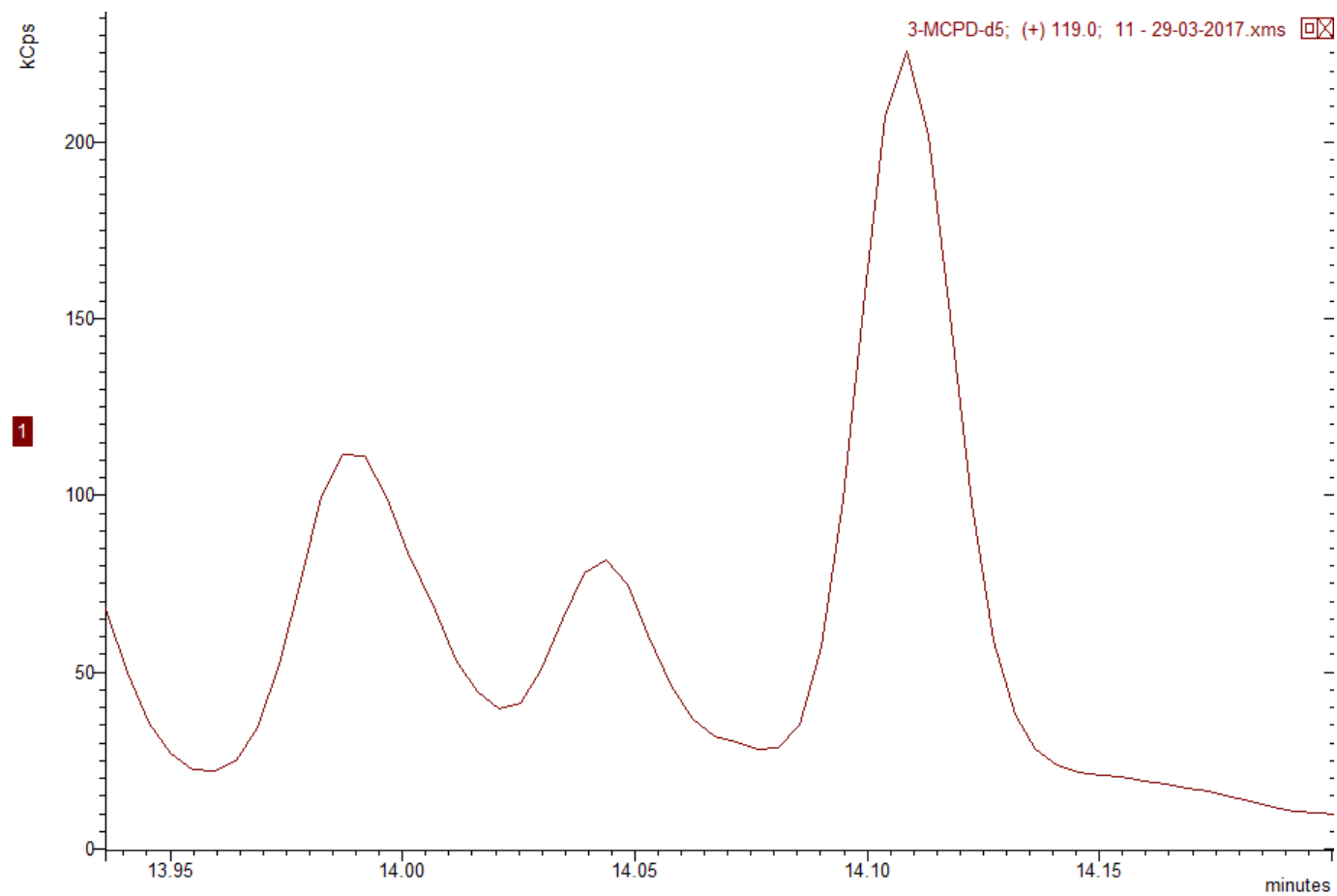


Figura B 88-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão com farinha fornecedor Granel - ião 119

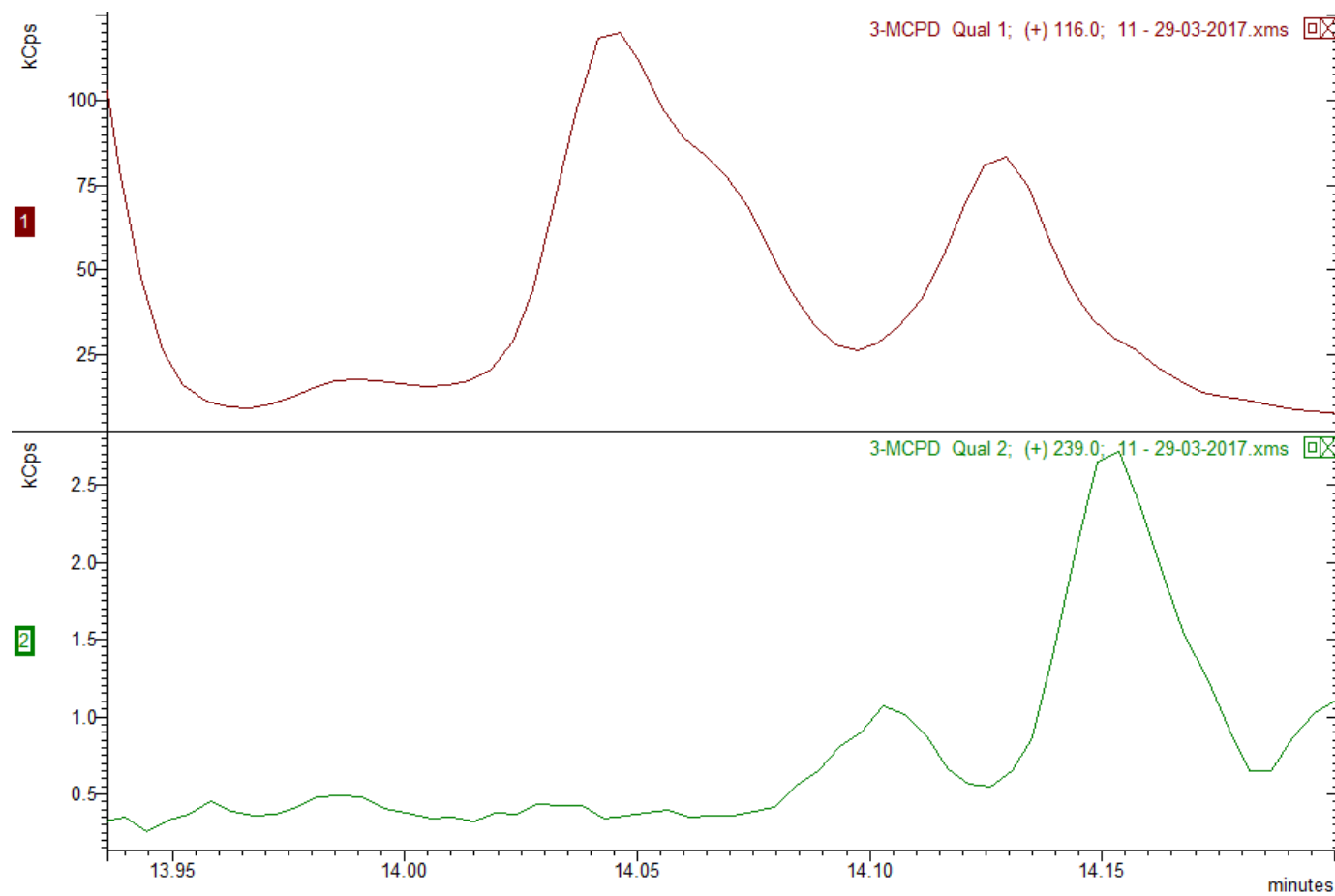


Figura B 89-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com farinha de fornecedor Granel - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

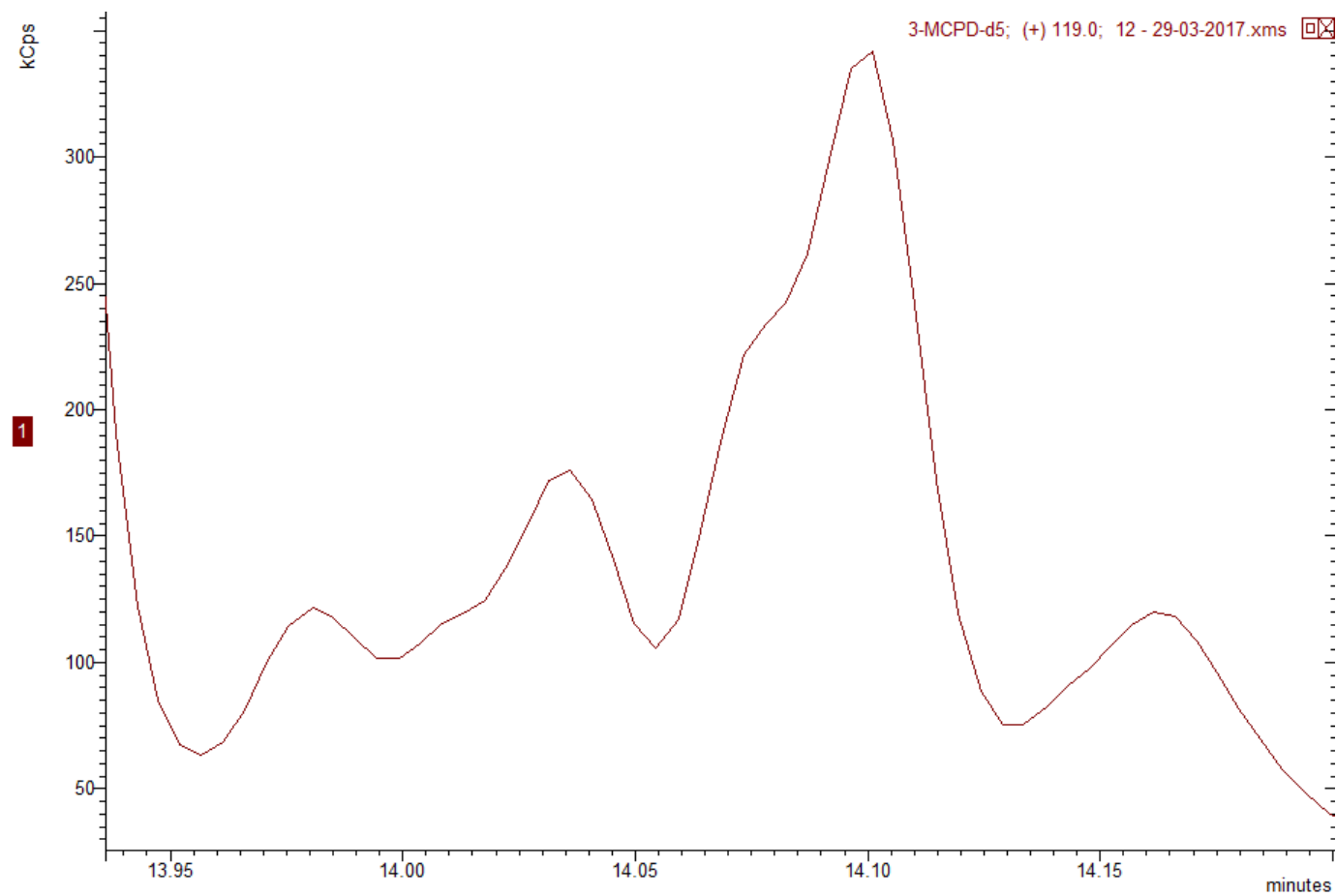


Figura B 90-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão Standart- ião119



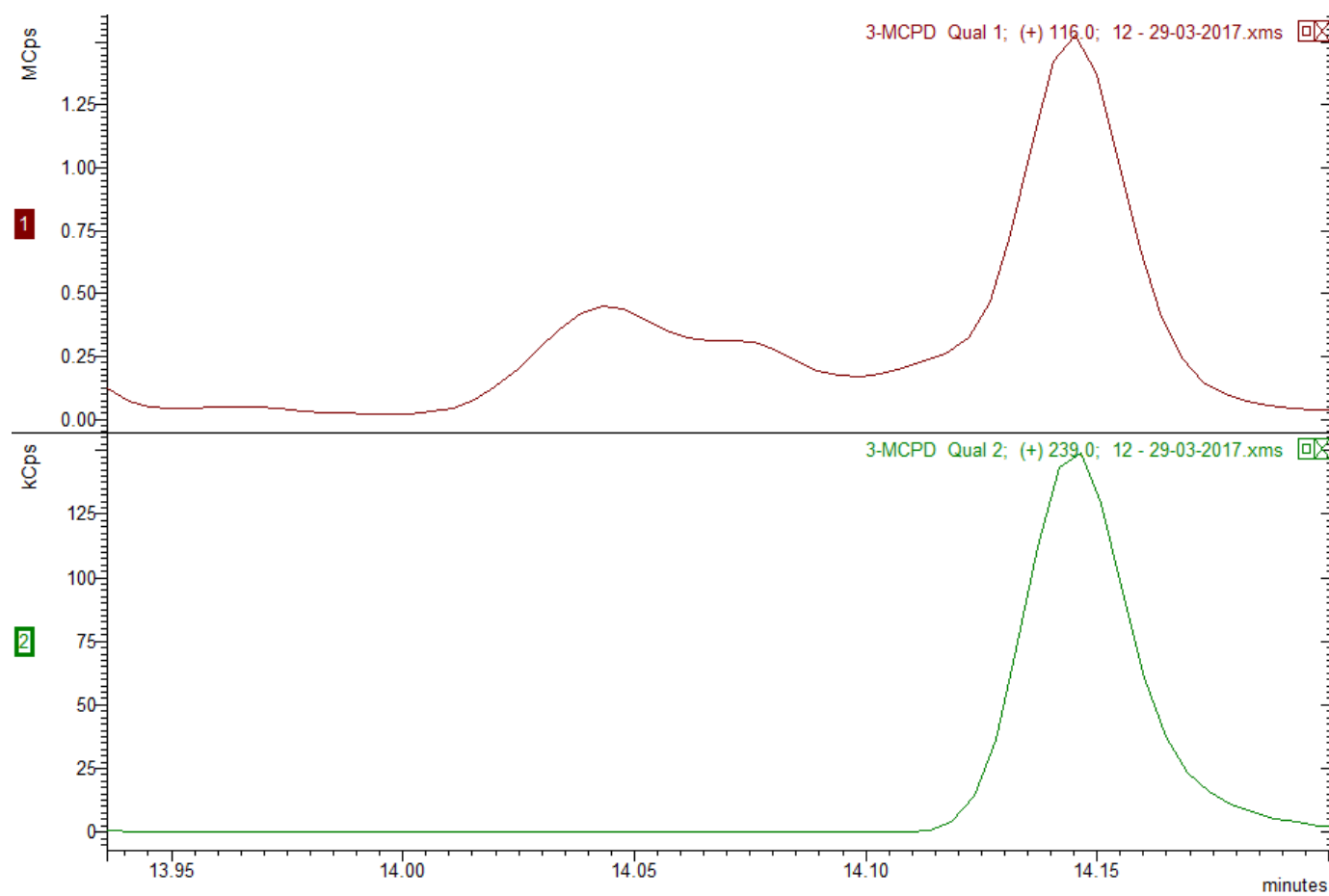


Figura B 91-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão Standart- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

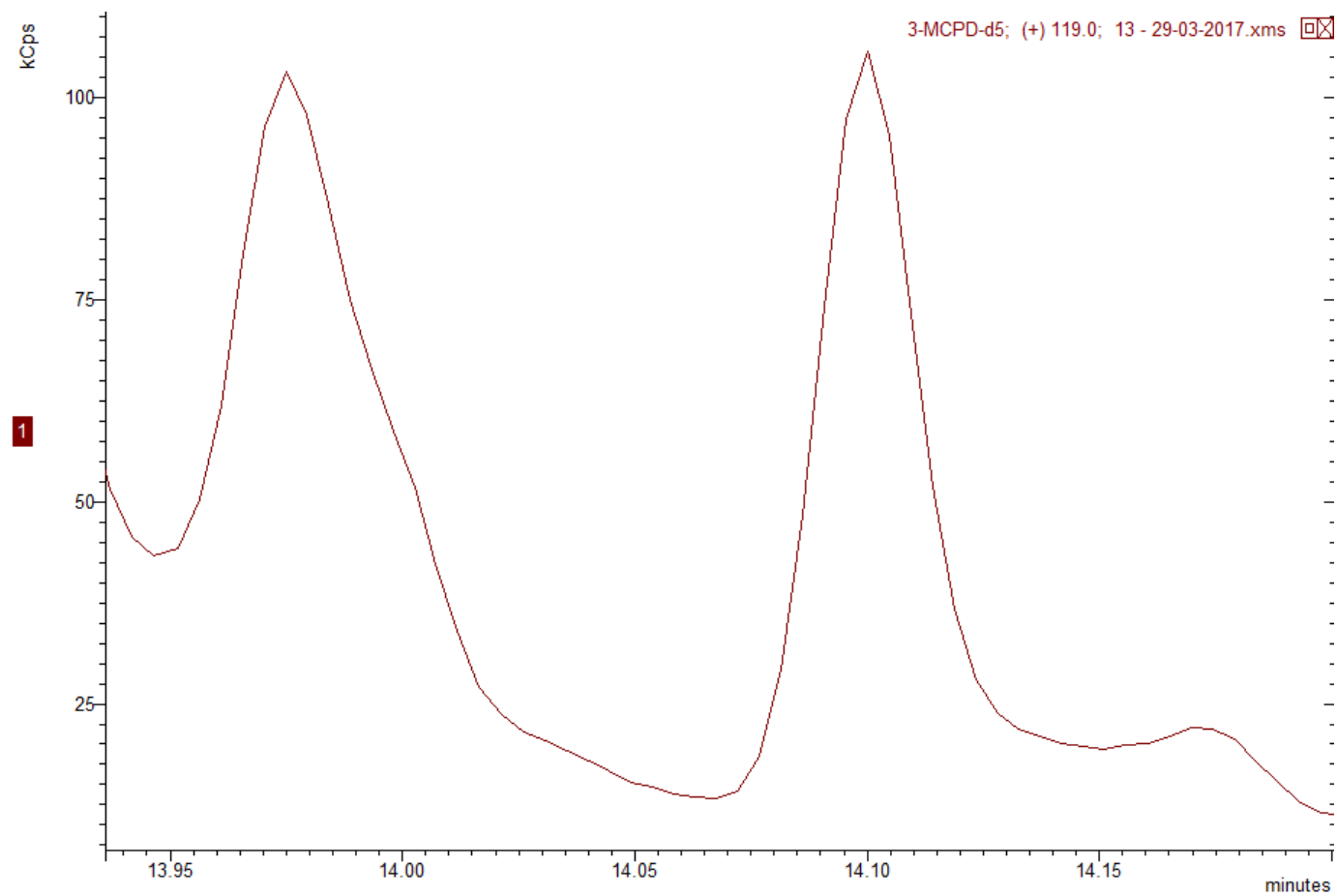


Figura B 92-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Limão dobro do sal- ião119

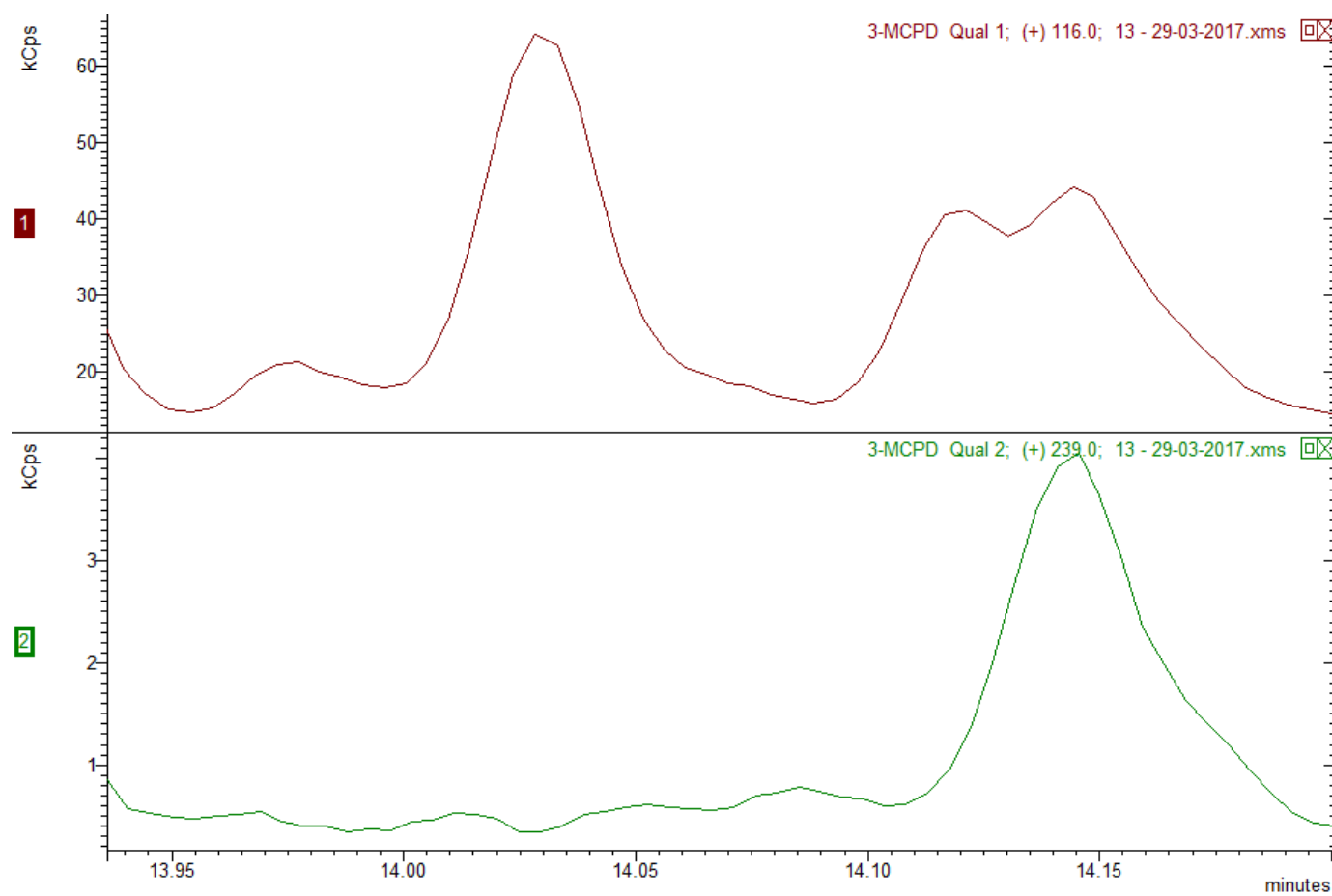
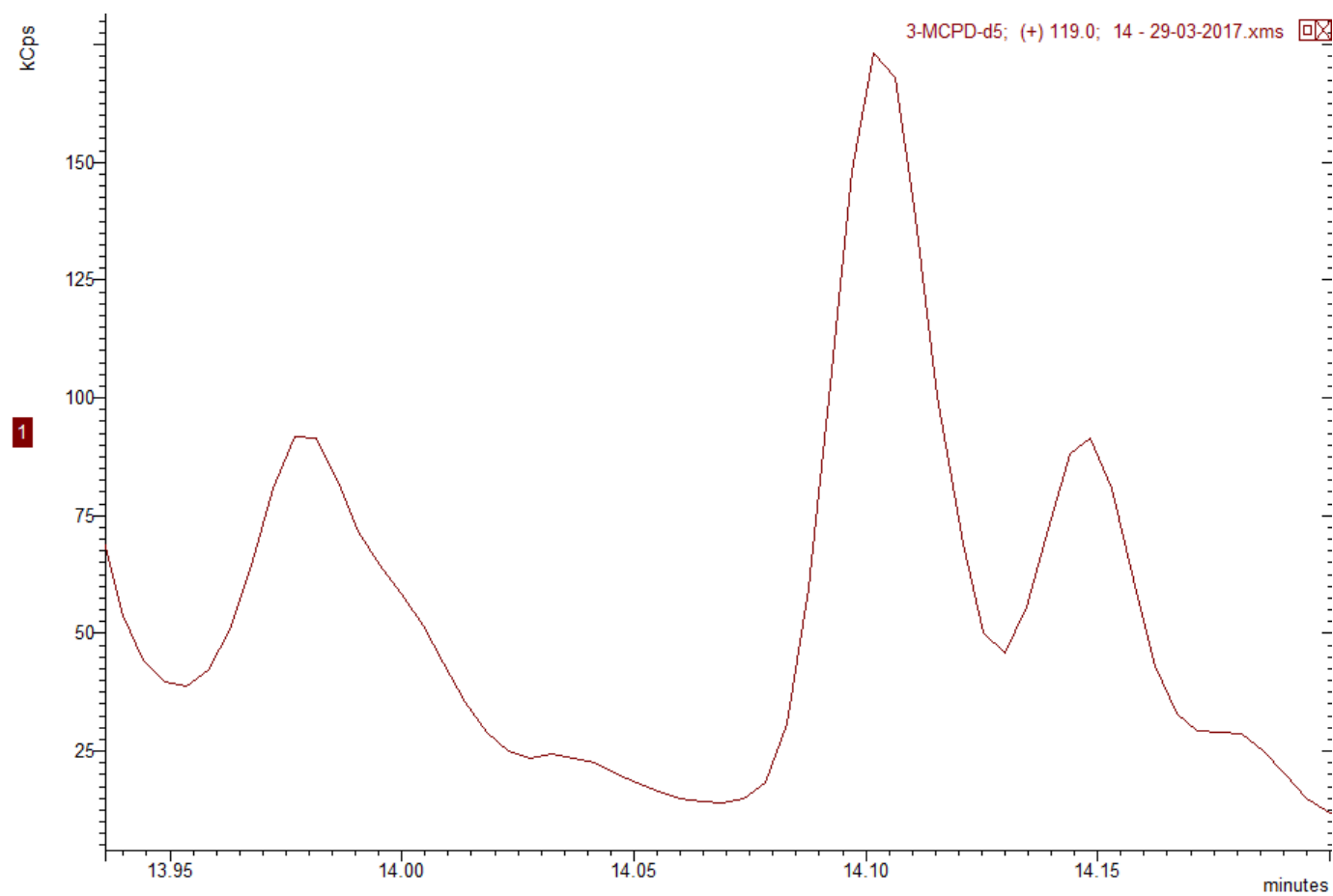


Figura B 93- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Limão com Dobro do Sal- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 94-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com metade do óleo de palma- ião119**

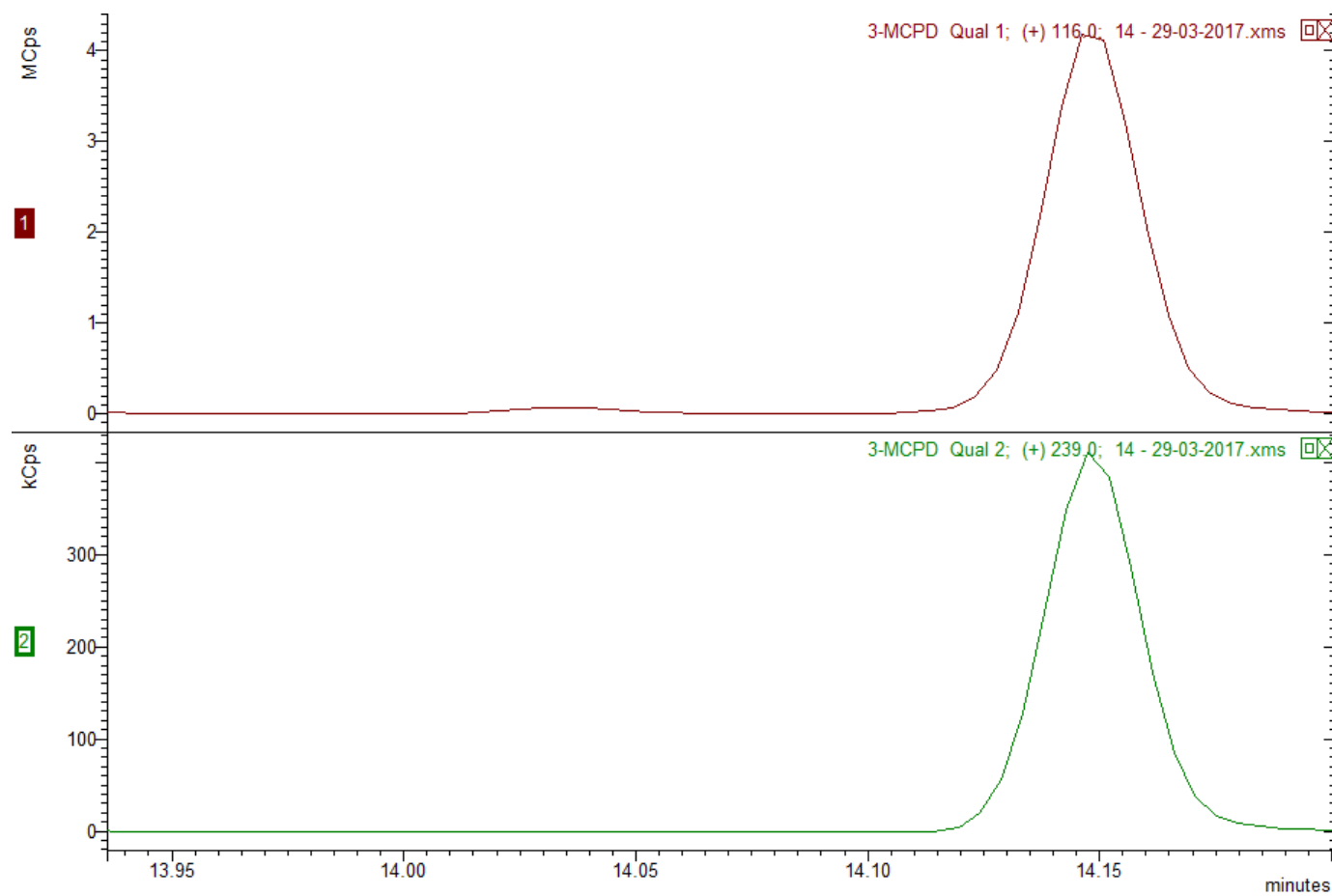
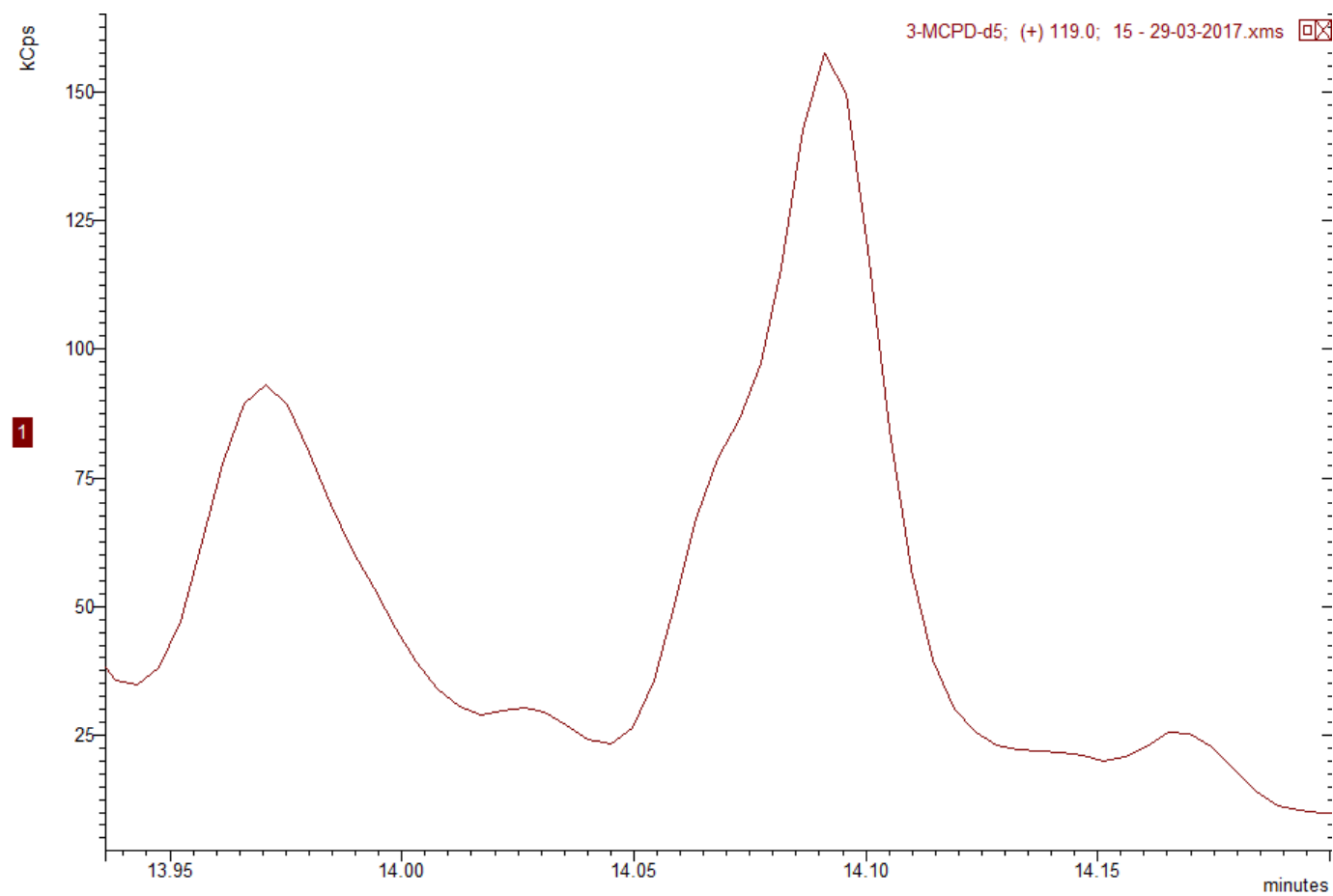


Figura B 95- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com metade do óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 96-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com cloro - ião119**

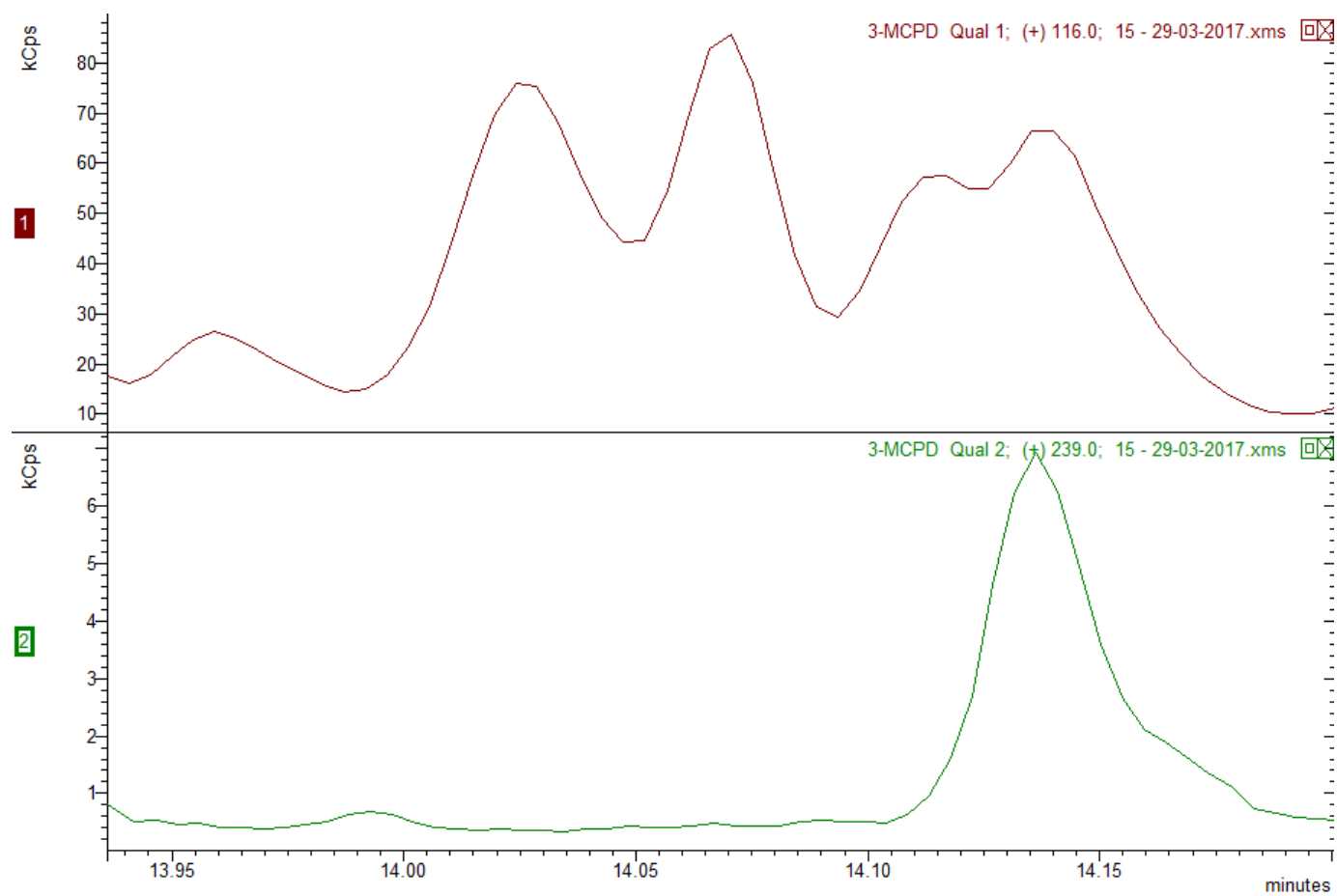


Figura B 97-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com cloro - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

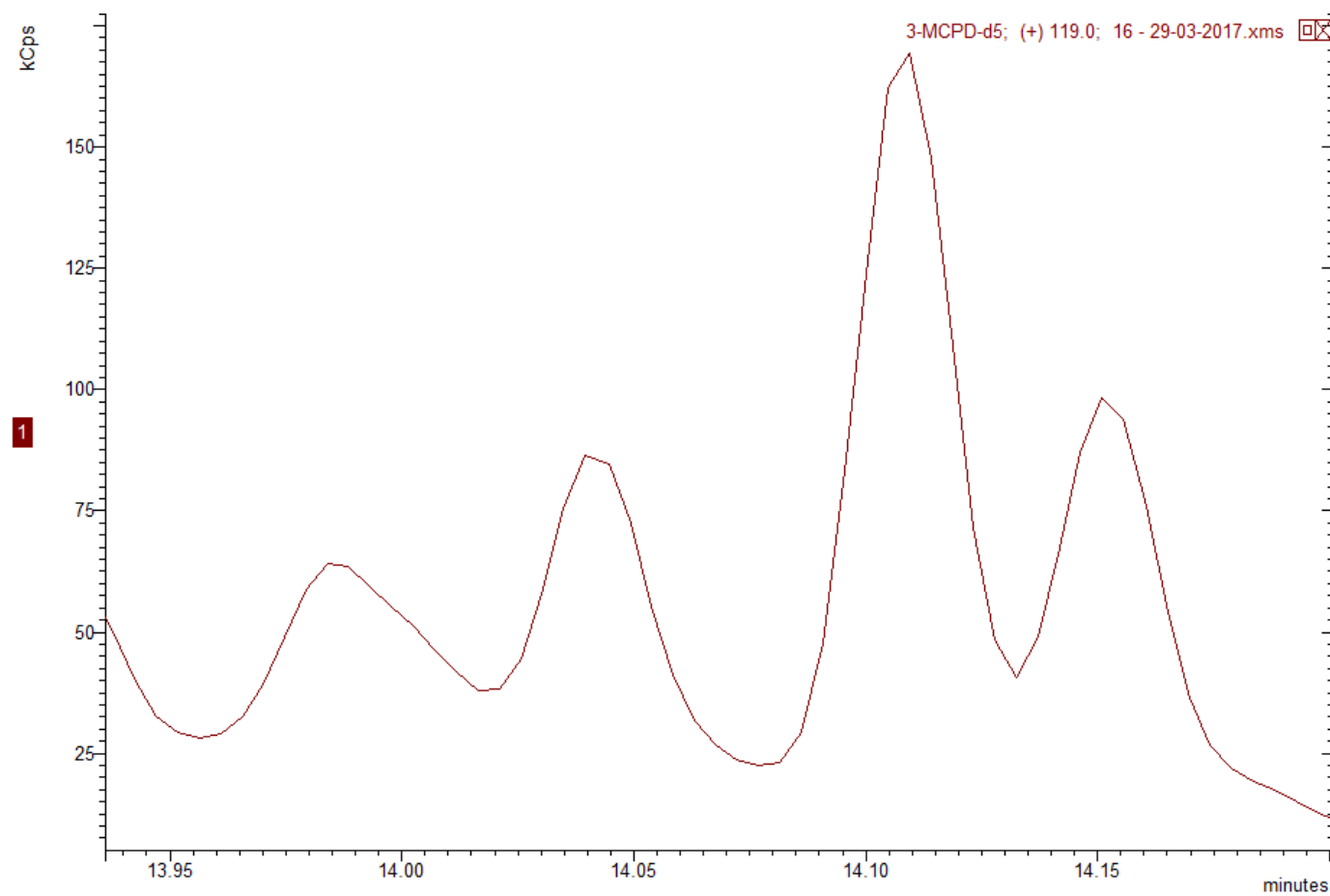


Figura B 98-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella sem óleo de palma - ião119



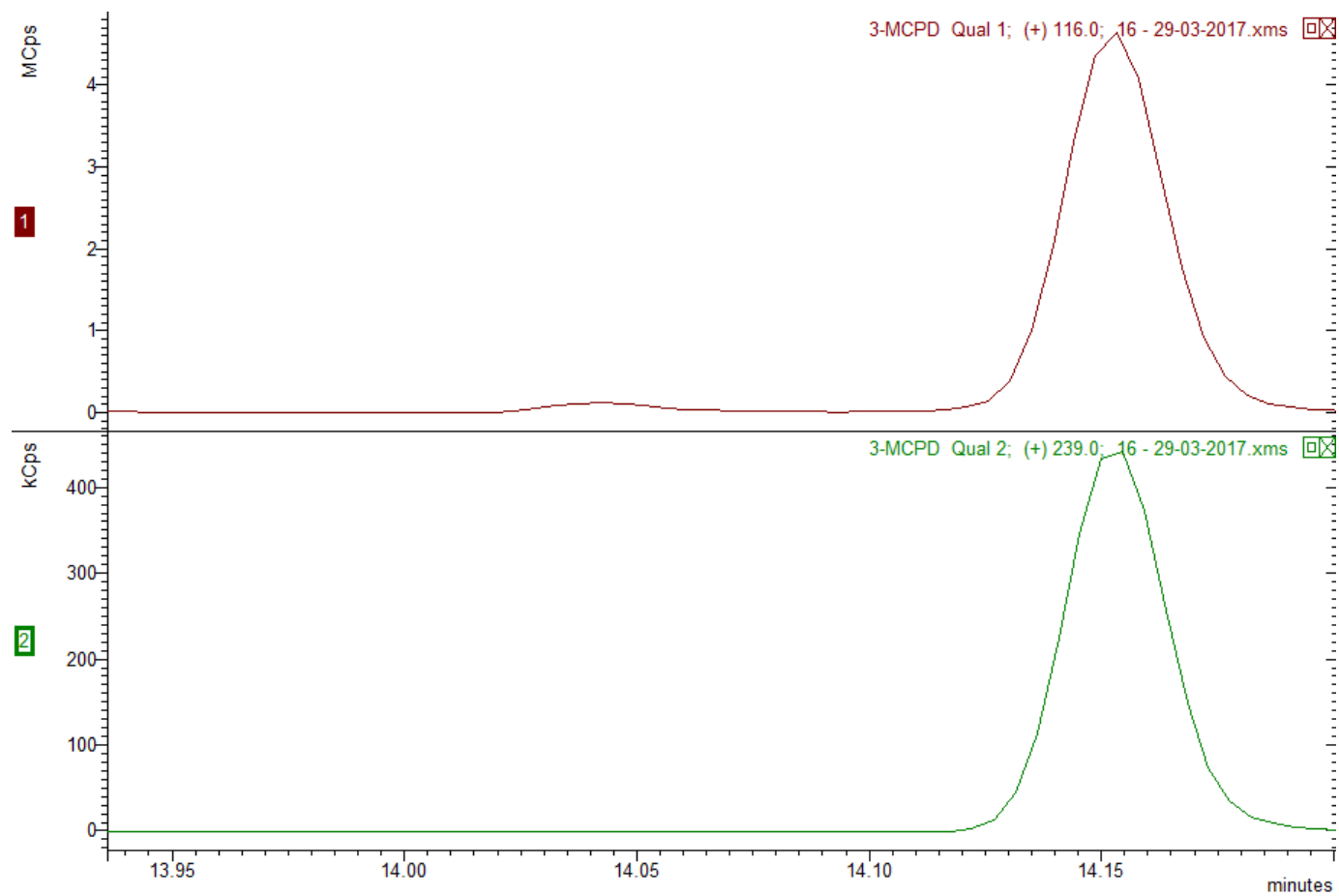


Figura B 99-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella sem óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

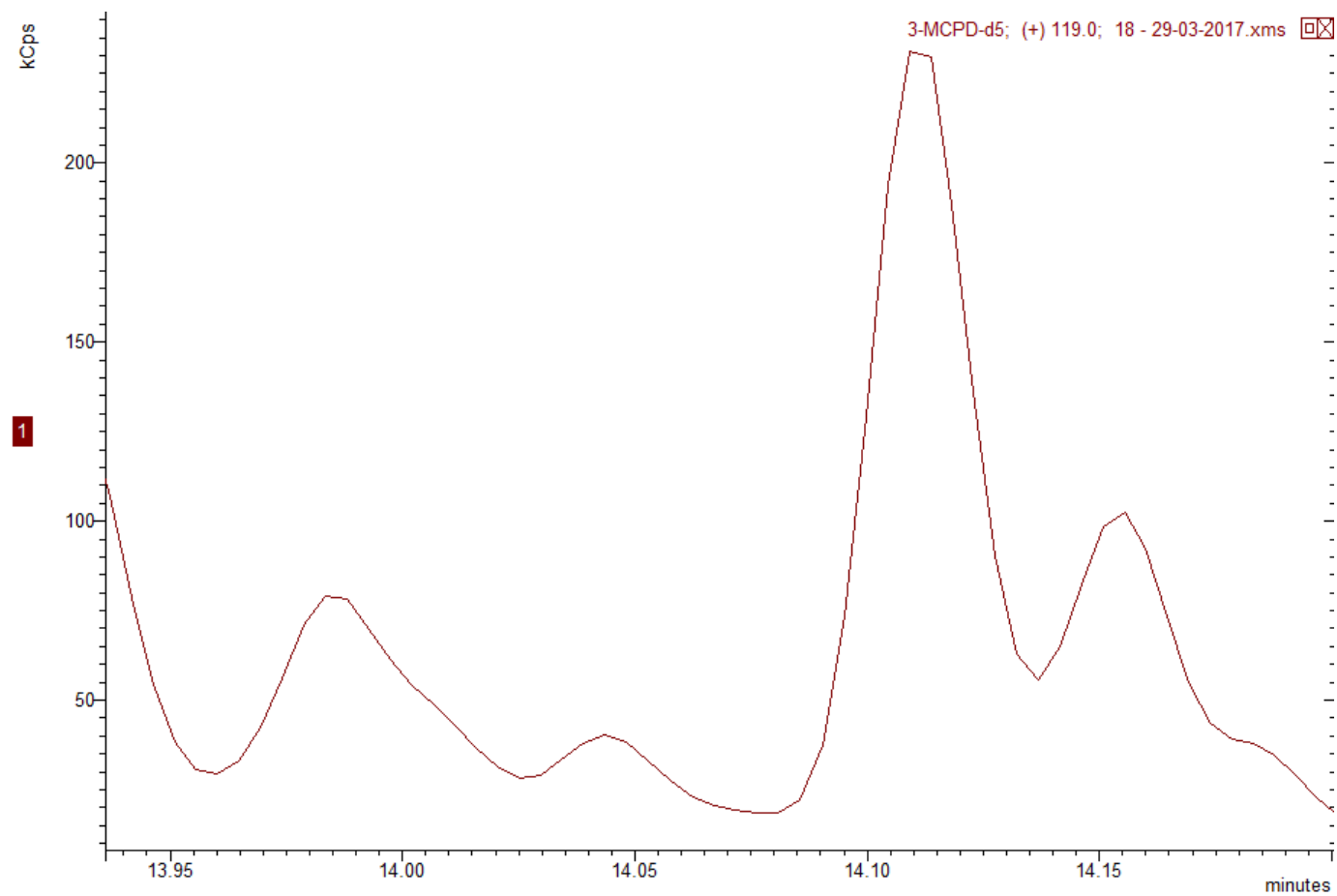


Figura B 100-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com água destilada- ião119

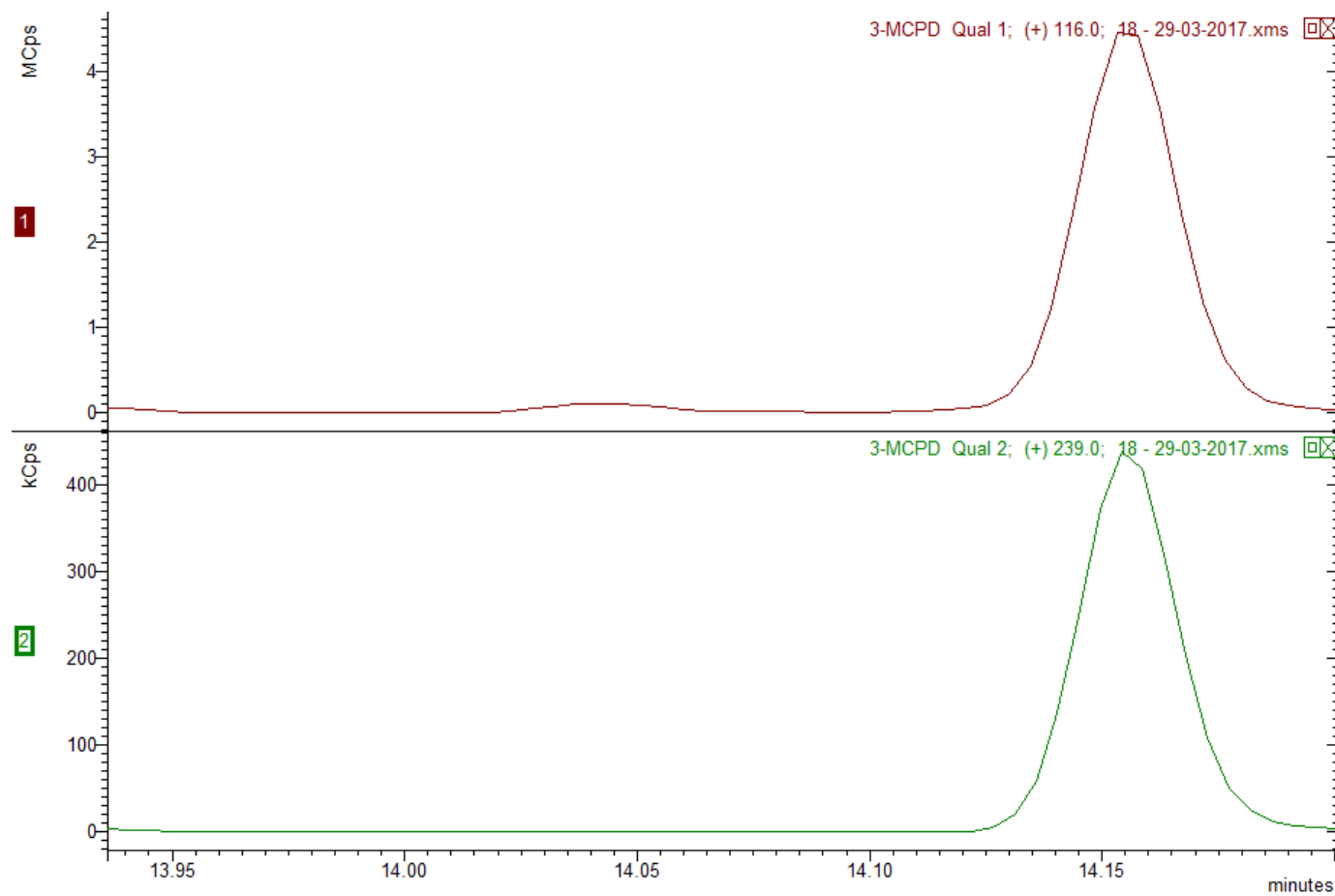


Figura B 101-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com água destilada- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

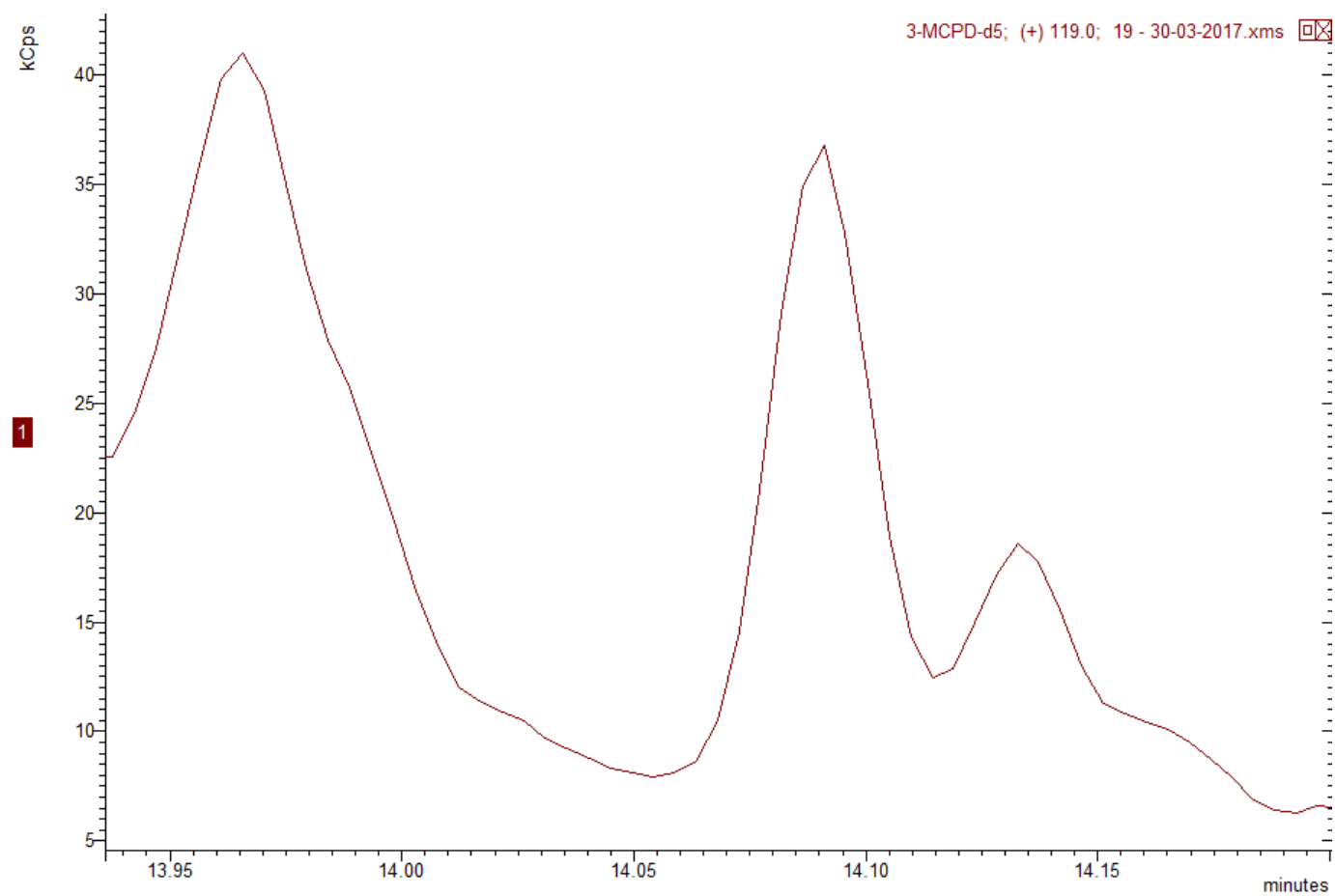


Figura B 102-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella com mínimo de óleo desmoldante- ião119

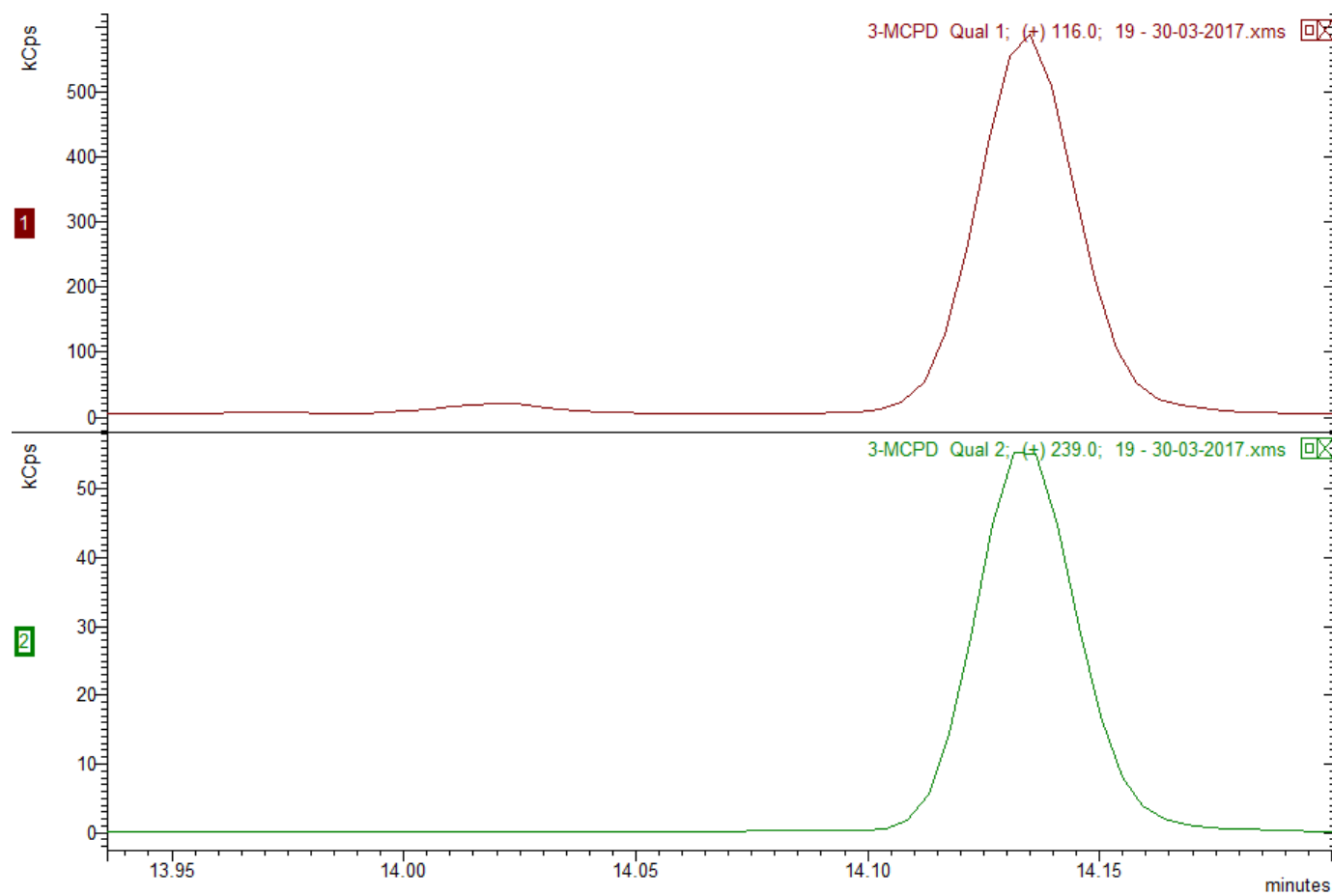
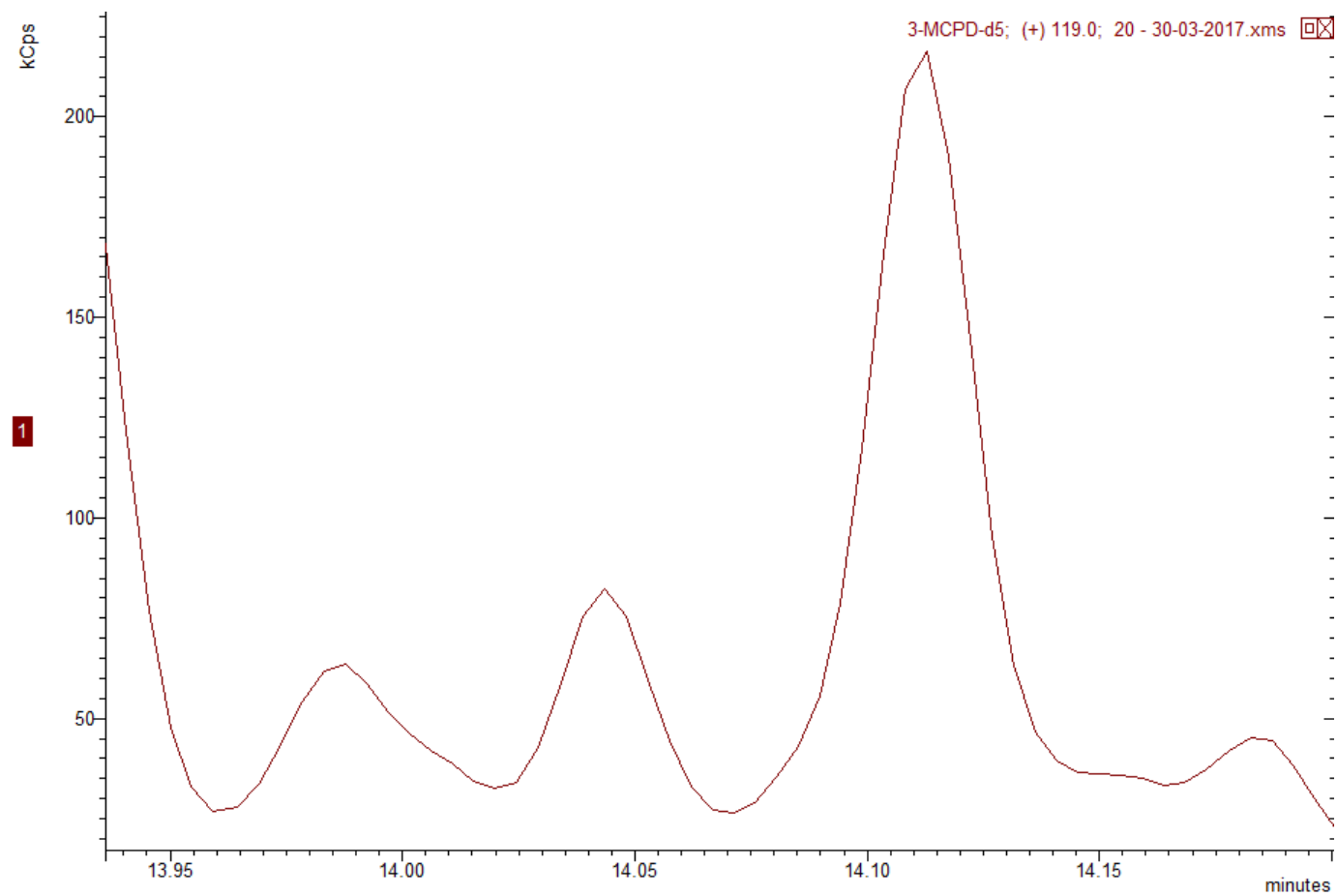


Figura B 103-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com mínimo de óleo desmoldante- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 104-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Straciatella com triplo de óleo desmoldante- ião119**

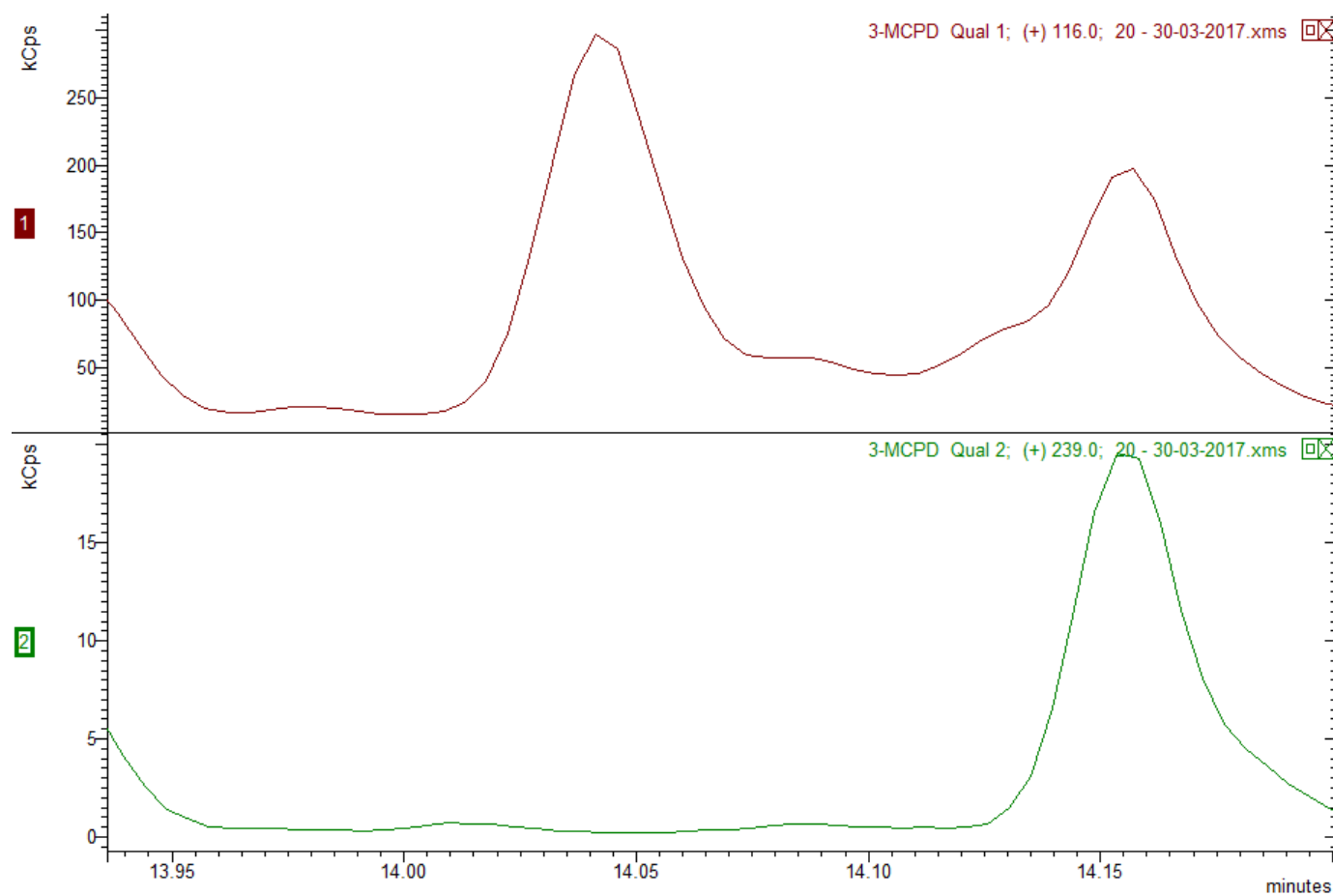


Figura B 105-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella com triplo de óleo desmoldante- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

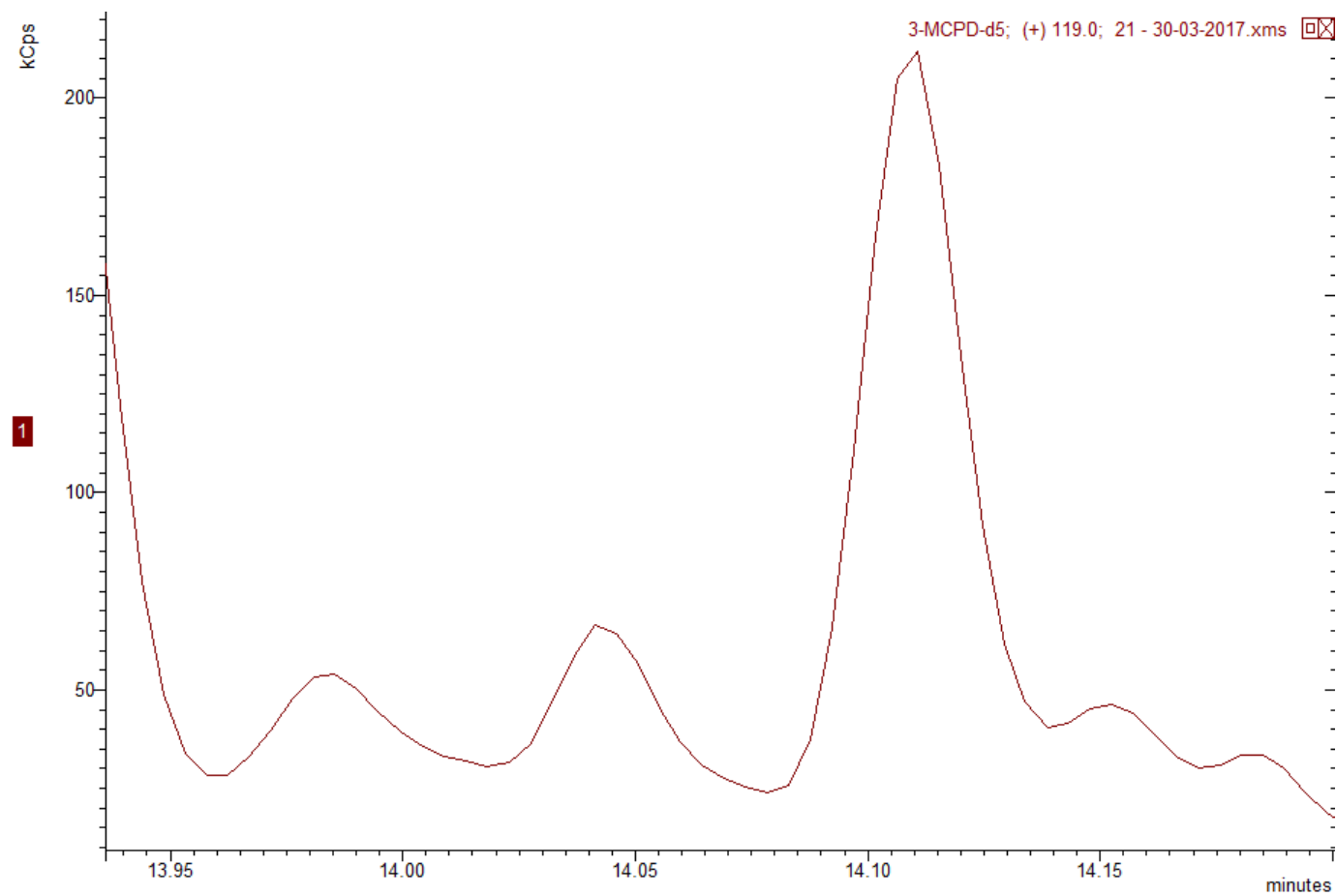


Figura B 106-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella sem glicerina- ião119



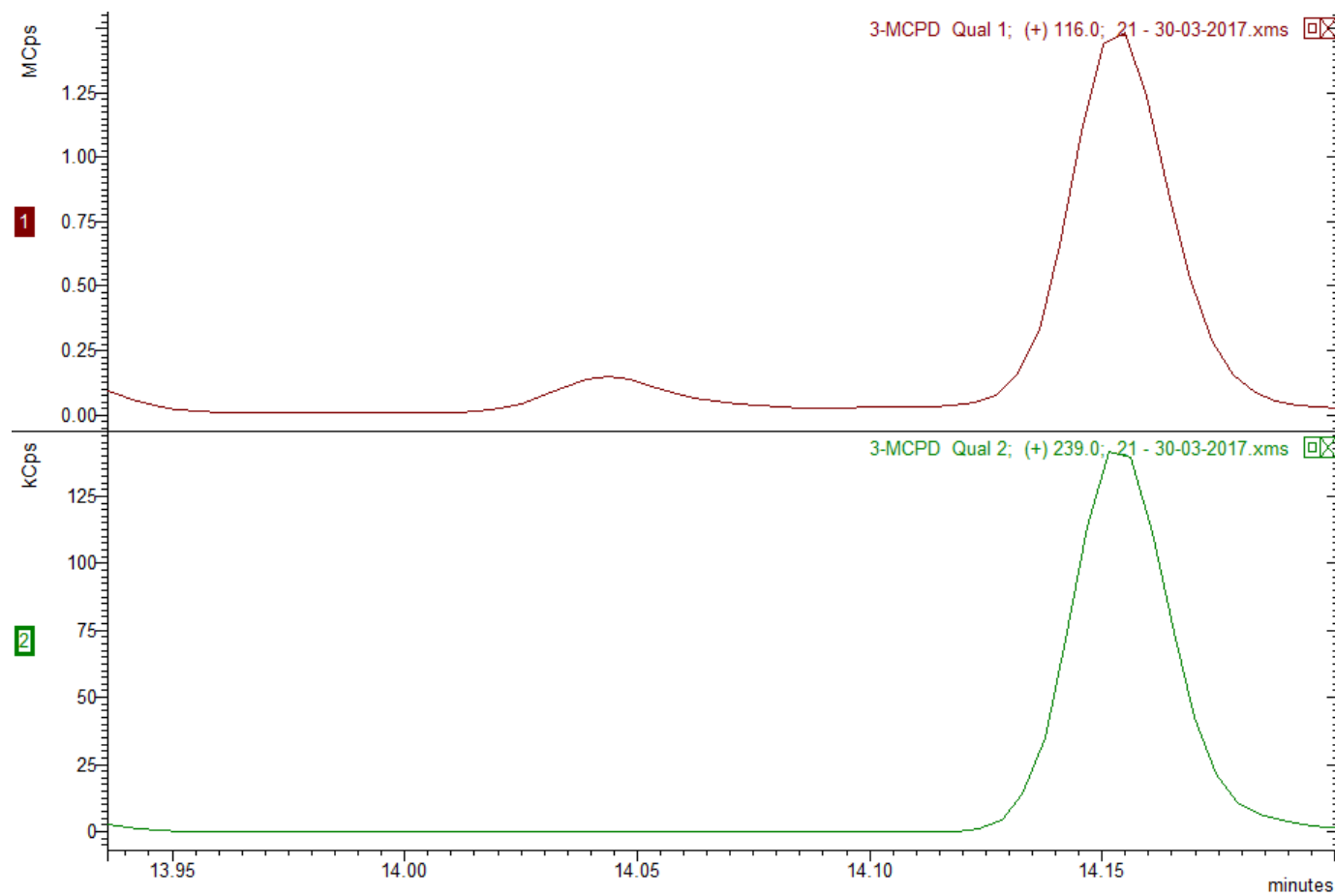


Figura B 107-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella sem glicerina - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

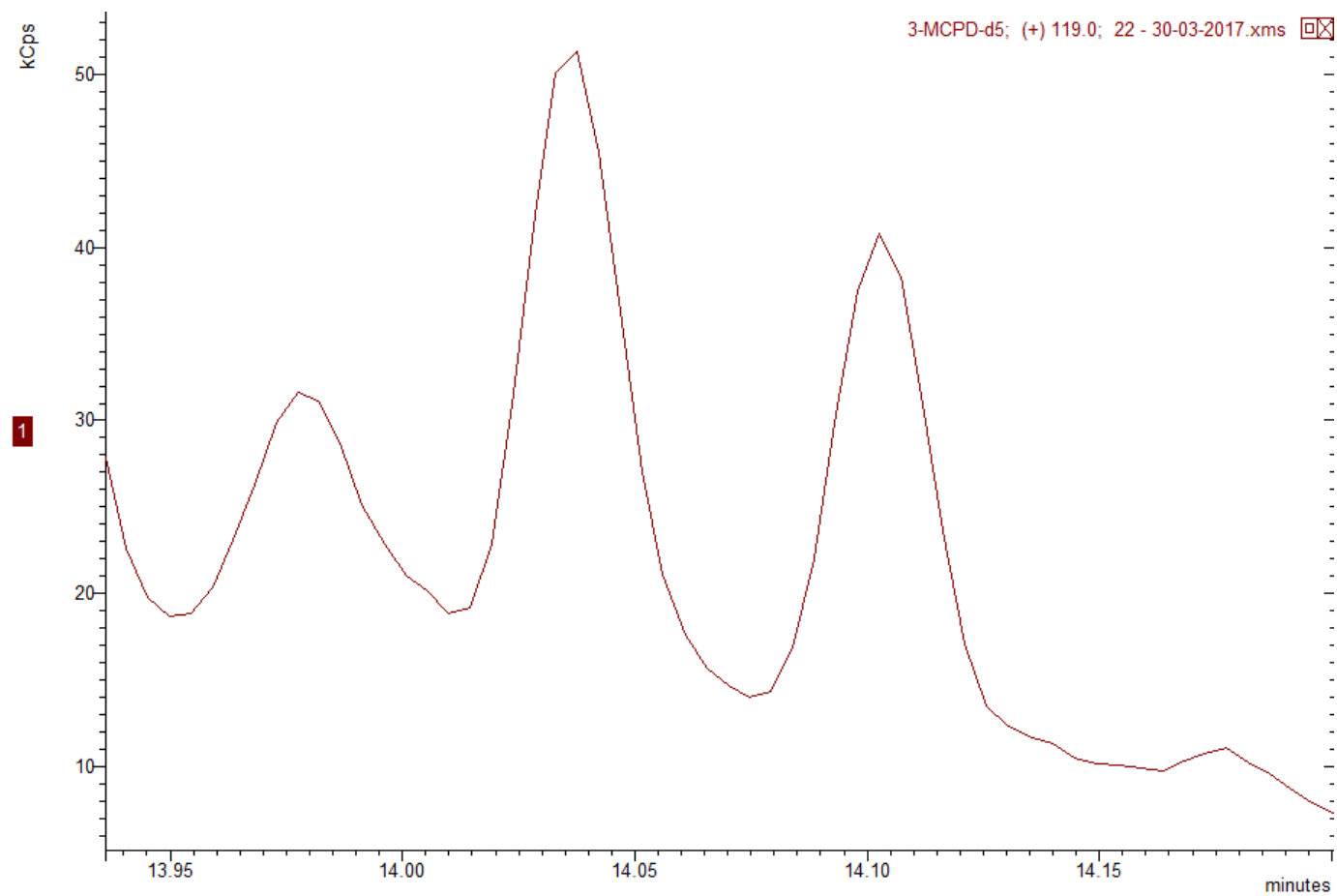


Figura B 108-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella fornecedor farinha Granel- ião119

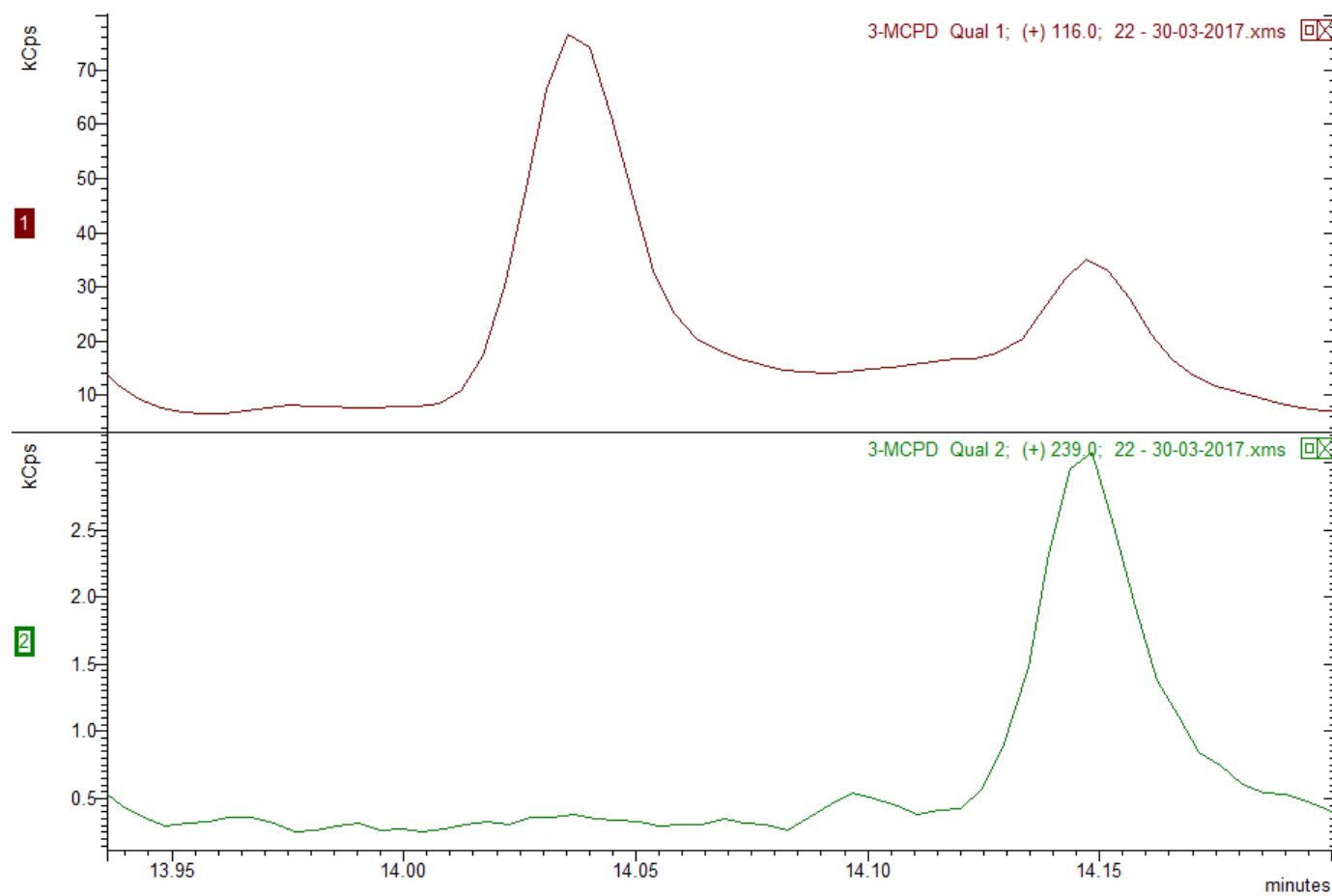
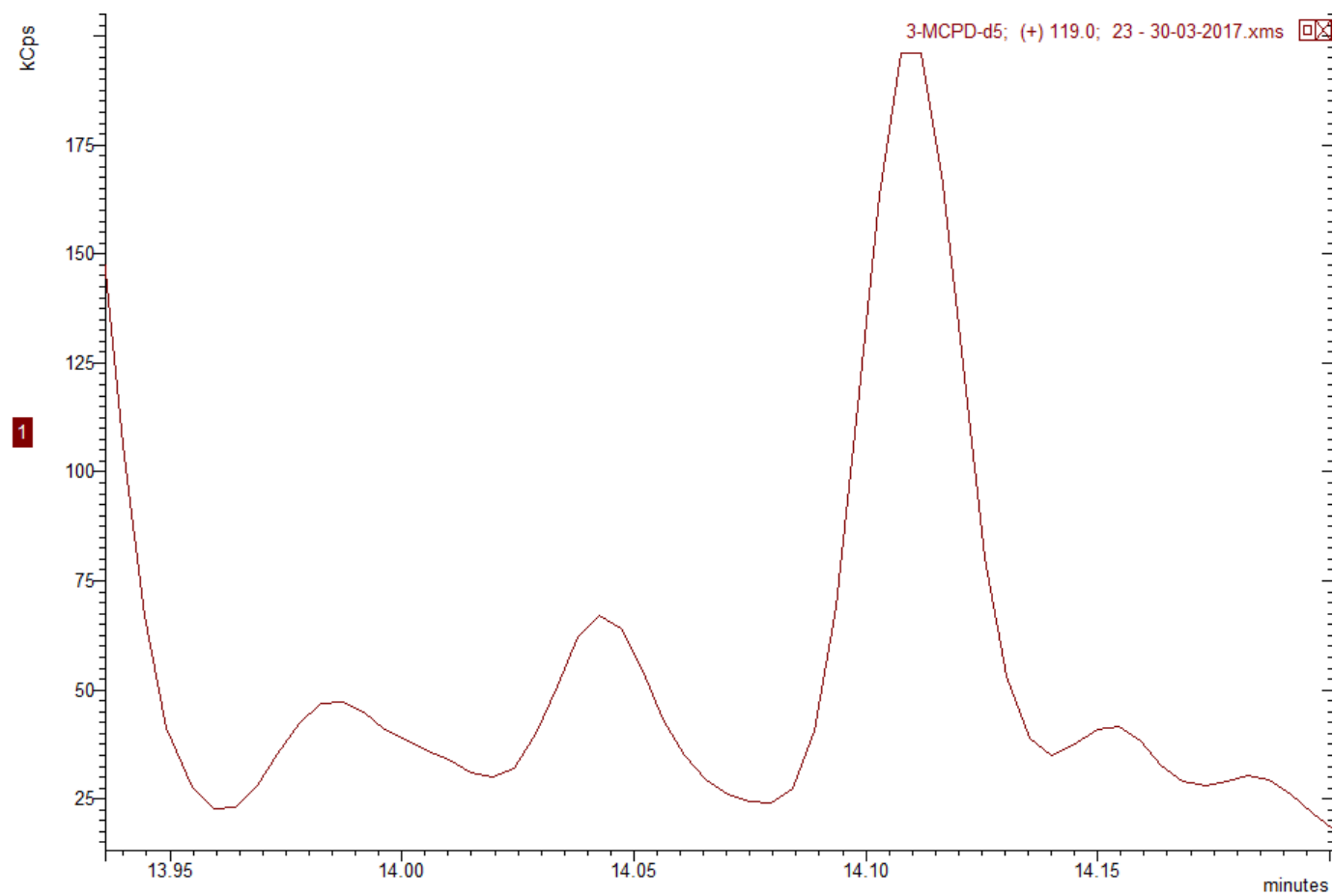


Figura B 109-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella fornecedor farinha Granel - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 110-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella Strandart - ião119**

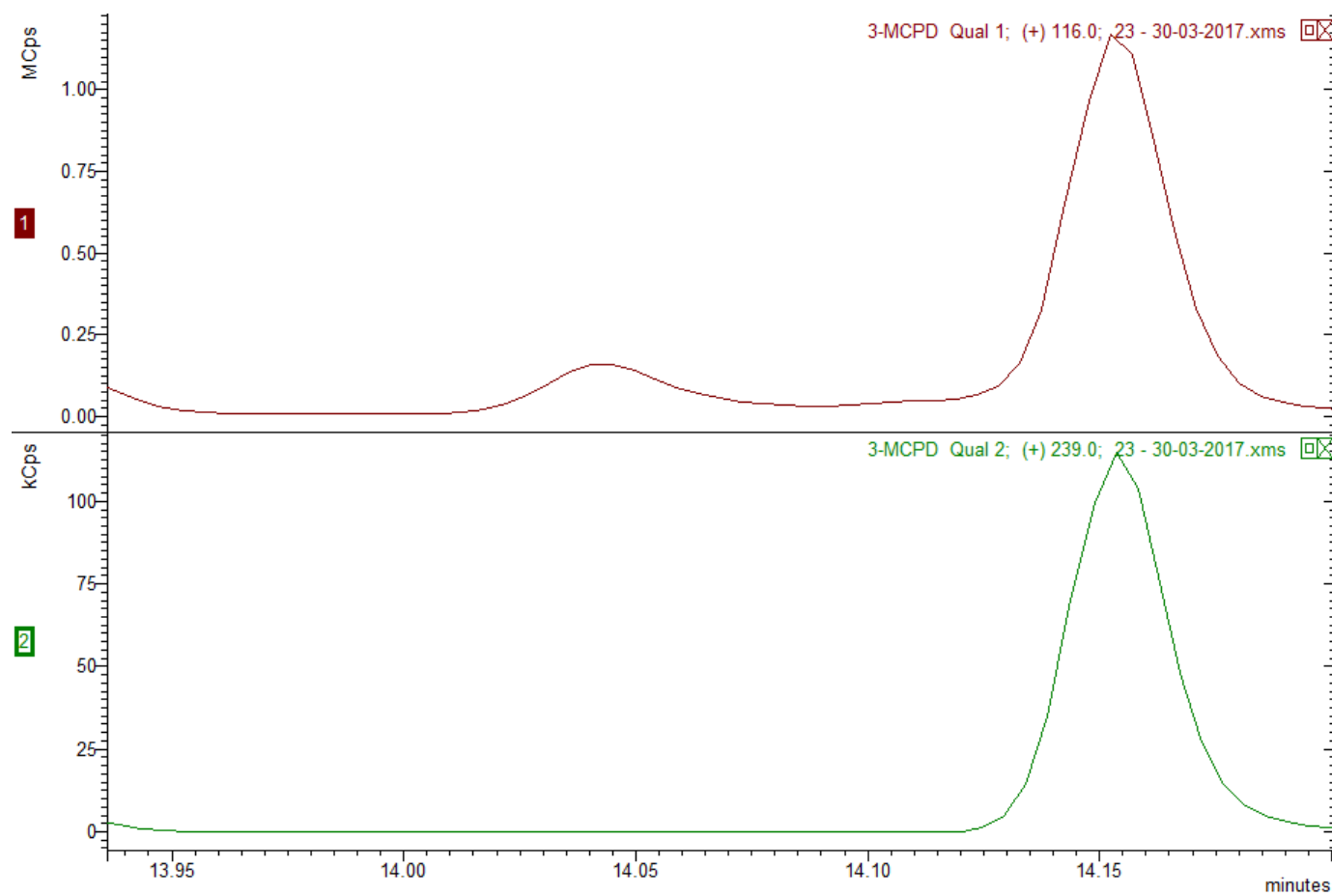
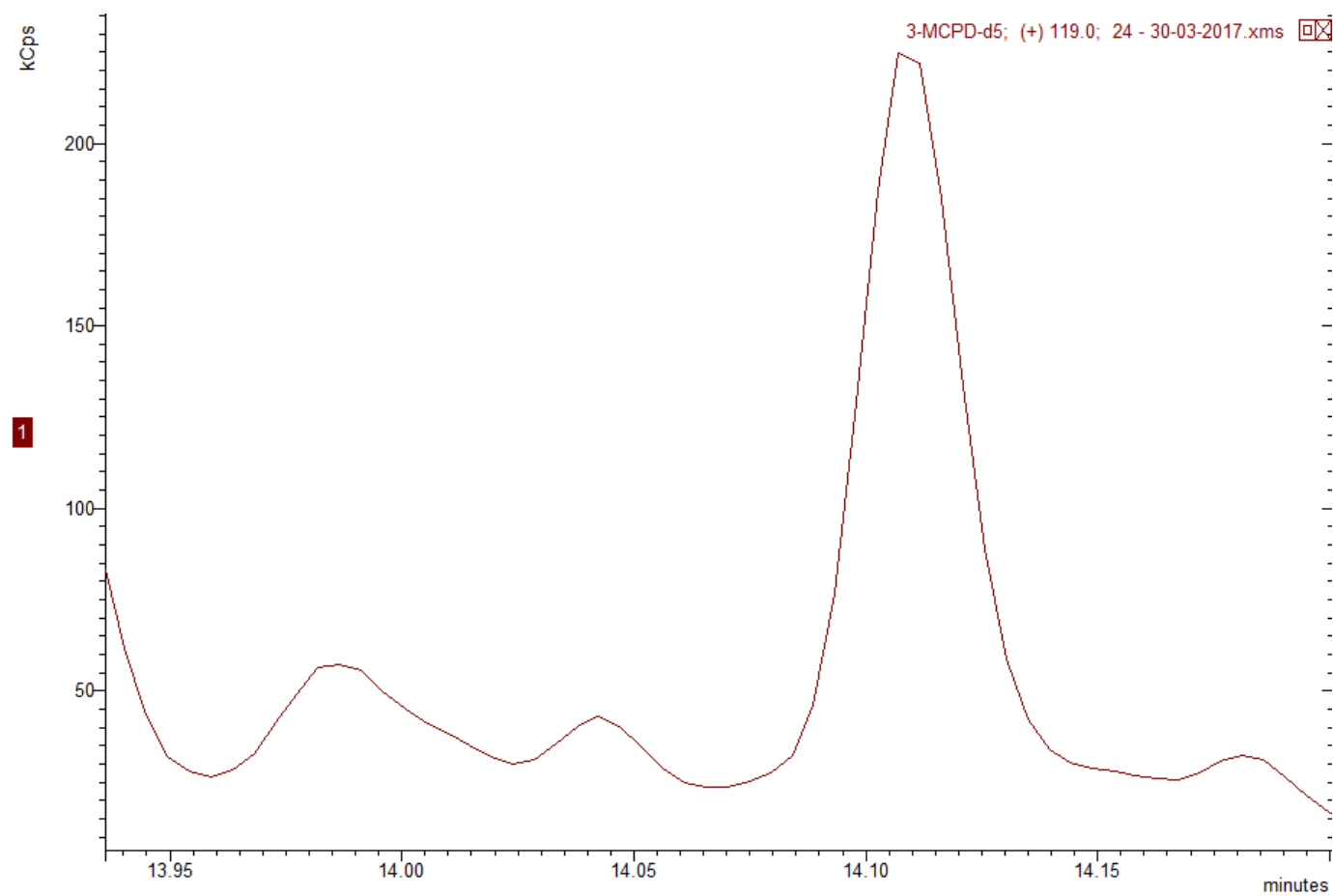


Figura B 111-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella Standart - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 112-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Stracciatella dobro do sal - ião119**

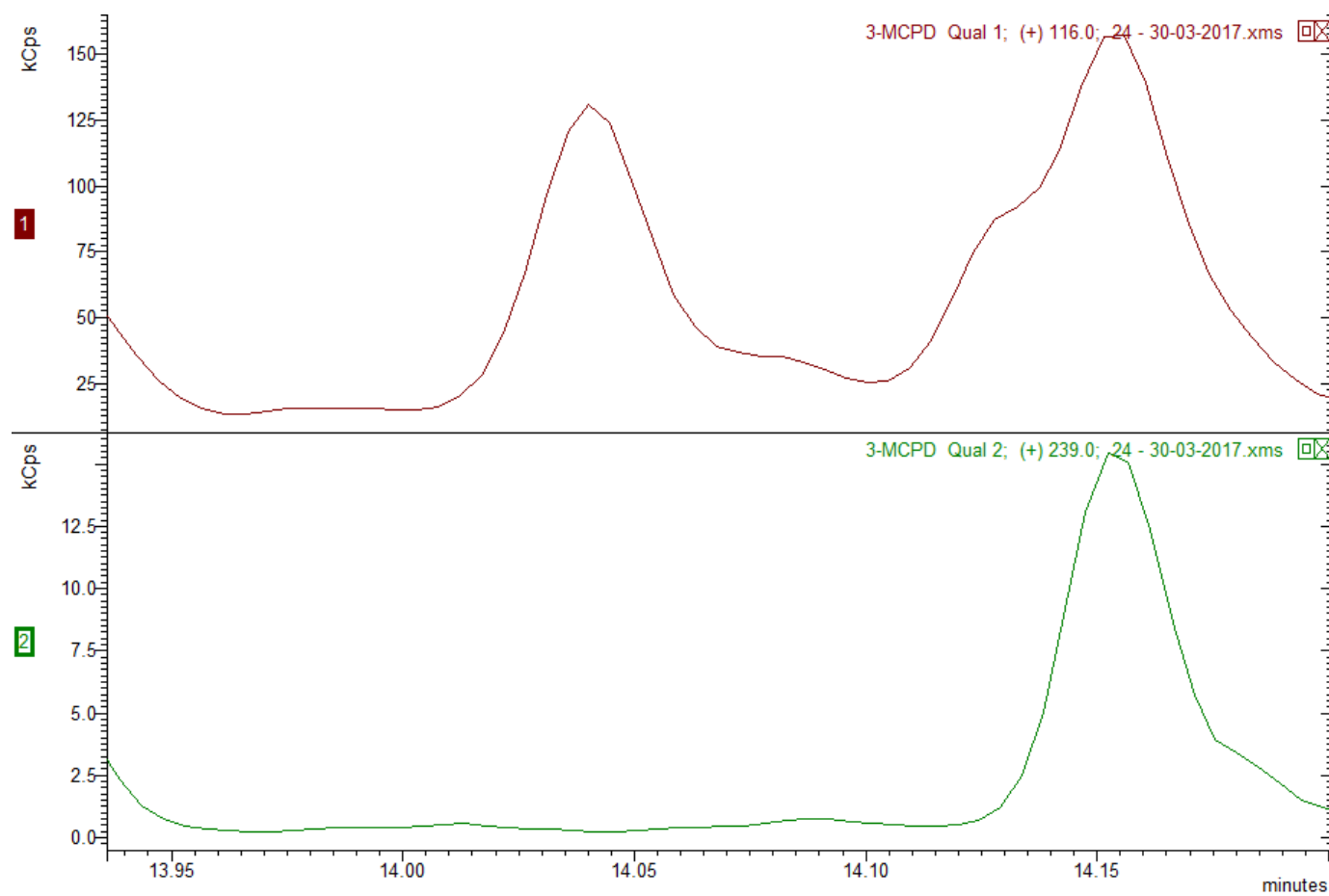
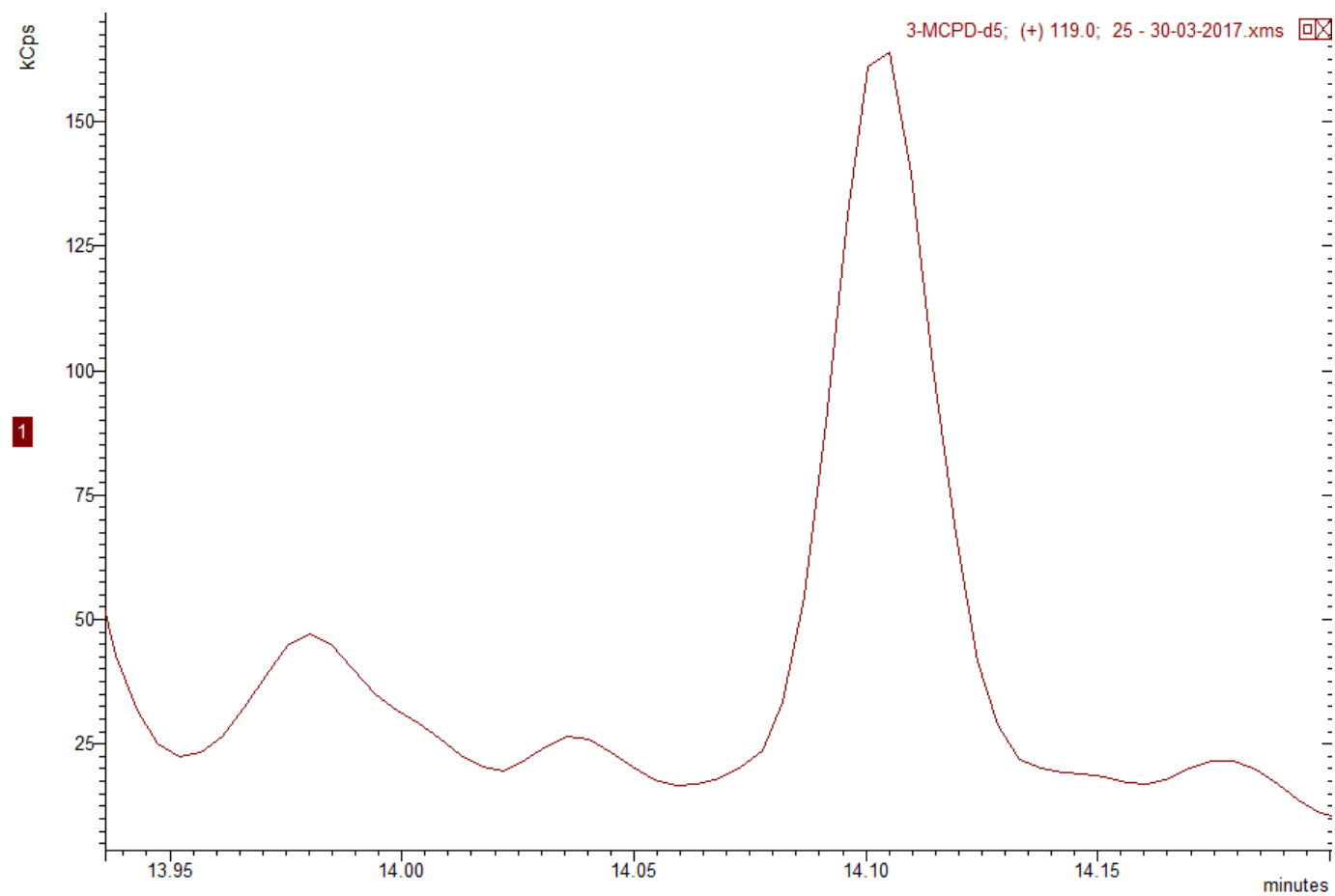


Figura B 113-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Stracciatella dobro do sal - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 114- Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacao metade do óleo de palma - ião119**



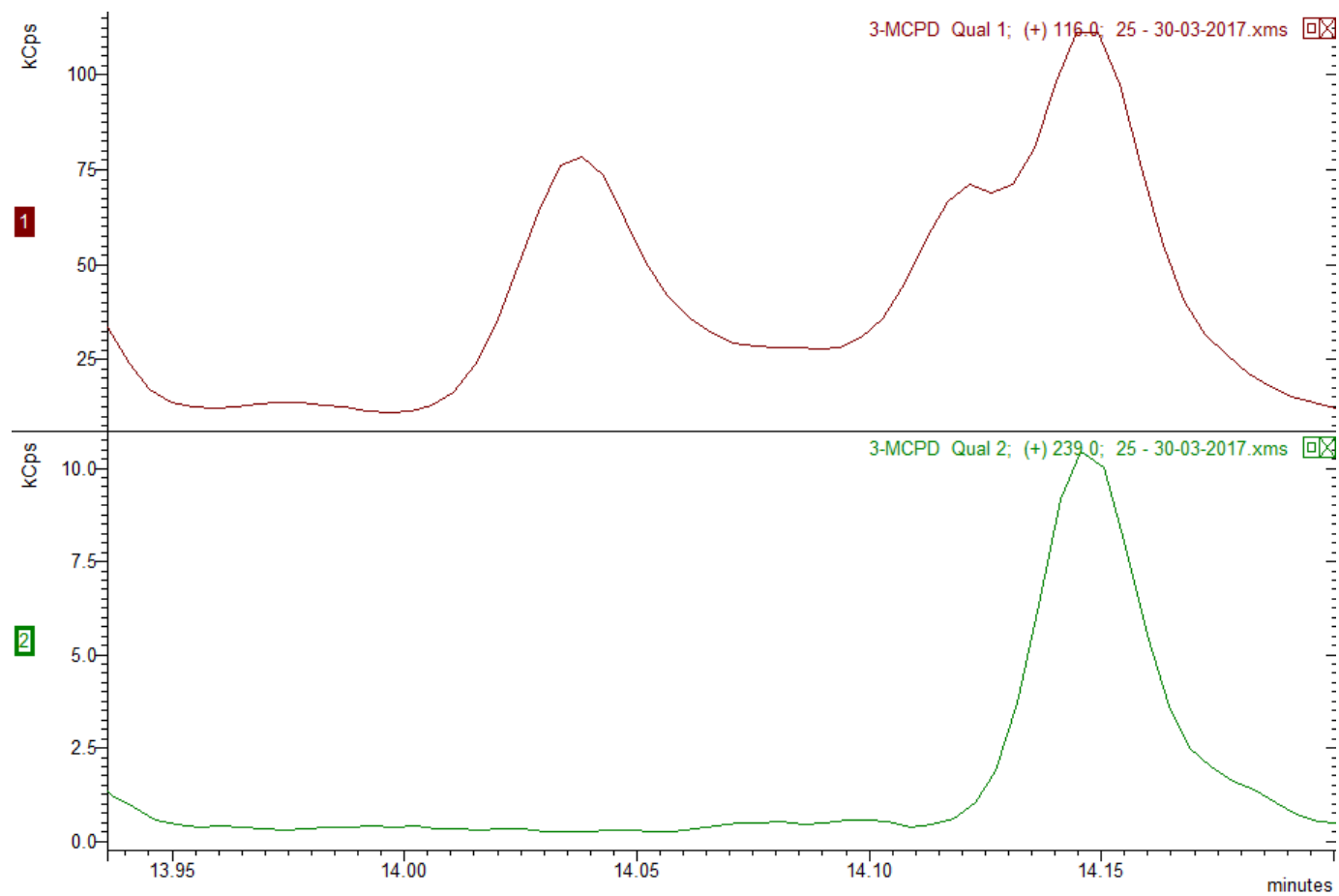


Figura B 115-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau metade do óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

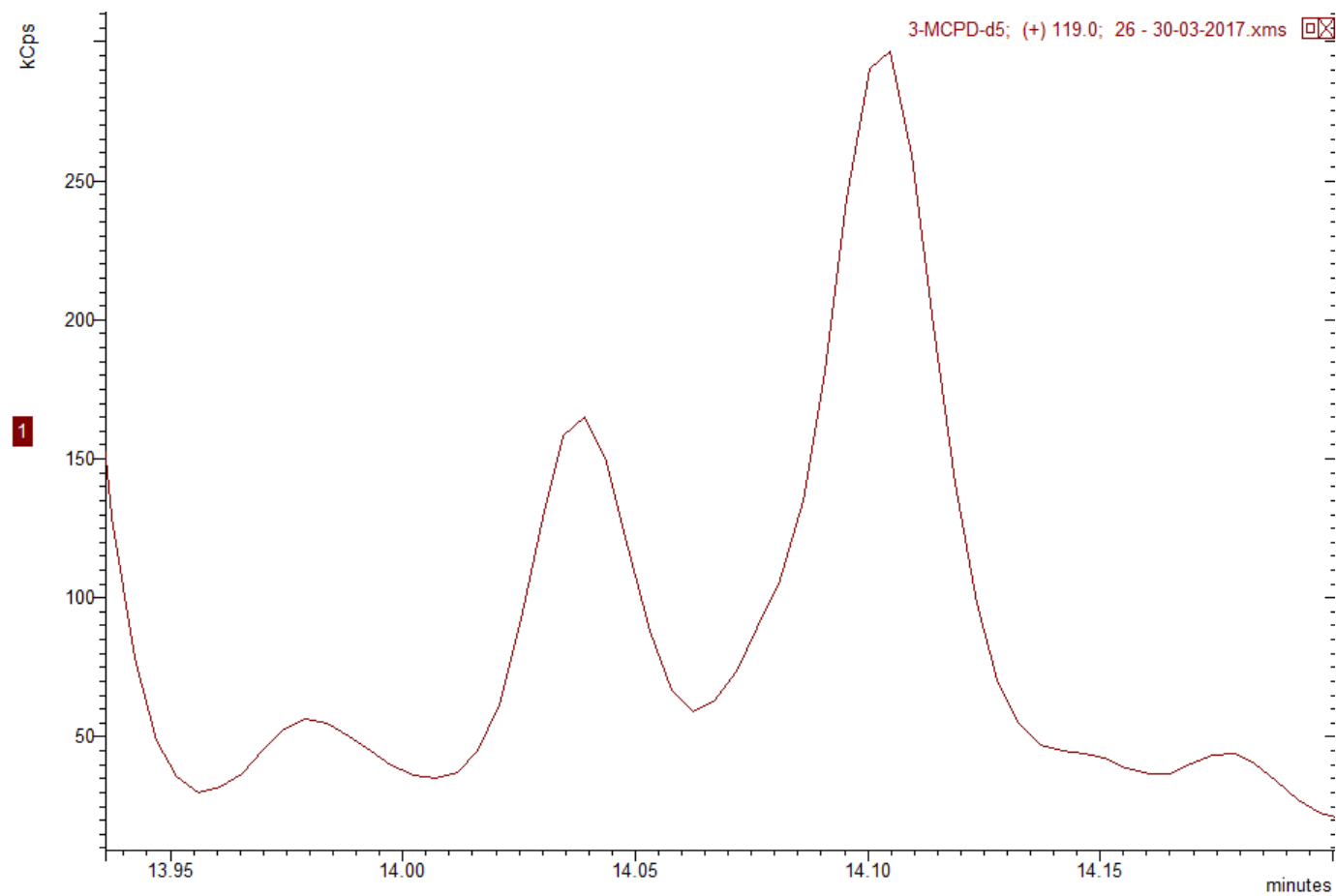


Figura B 116-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacao metade com cloro - ião119

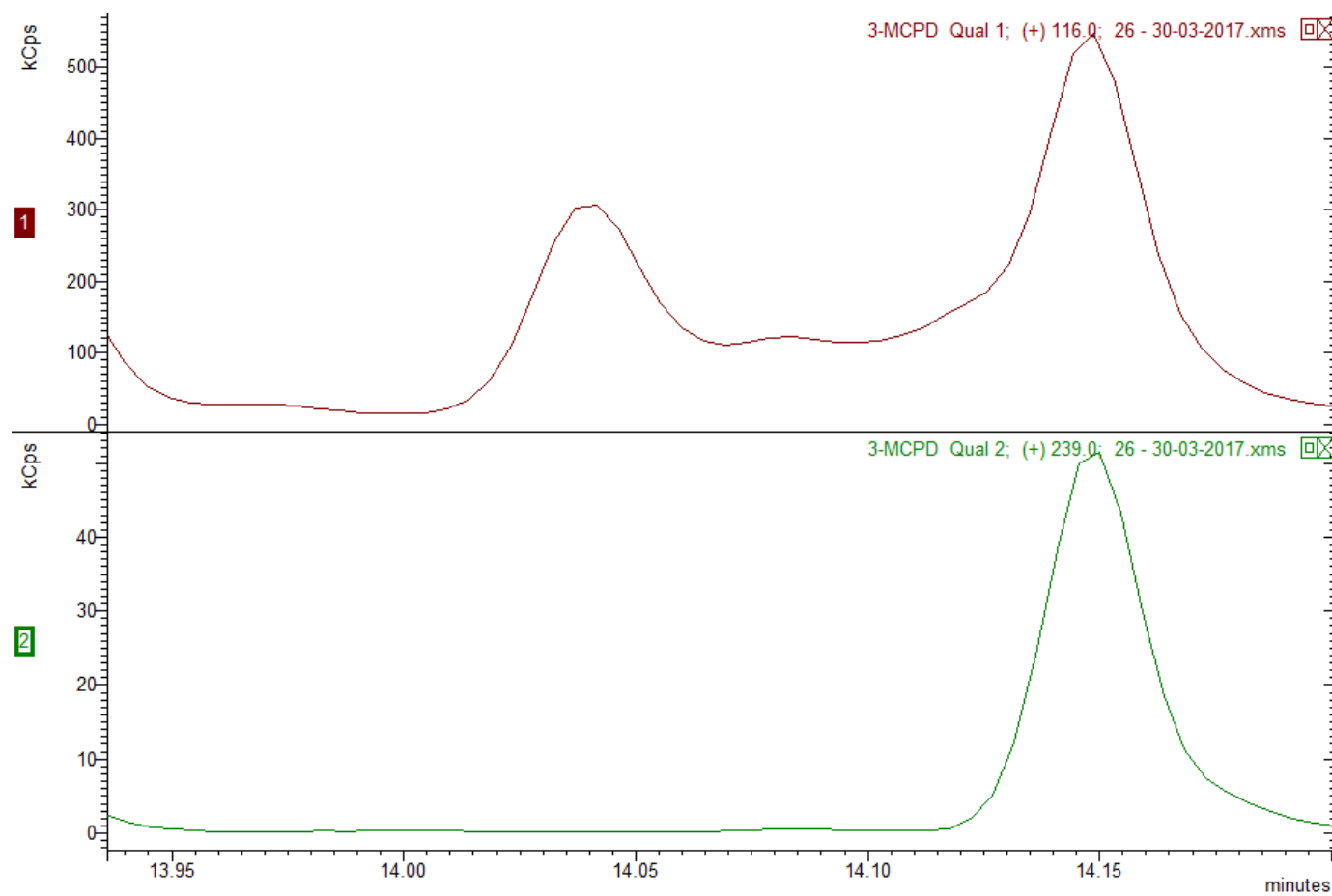
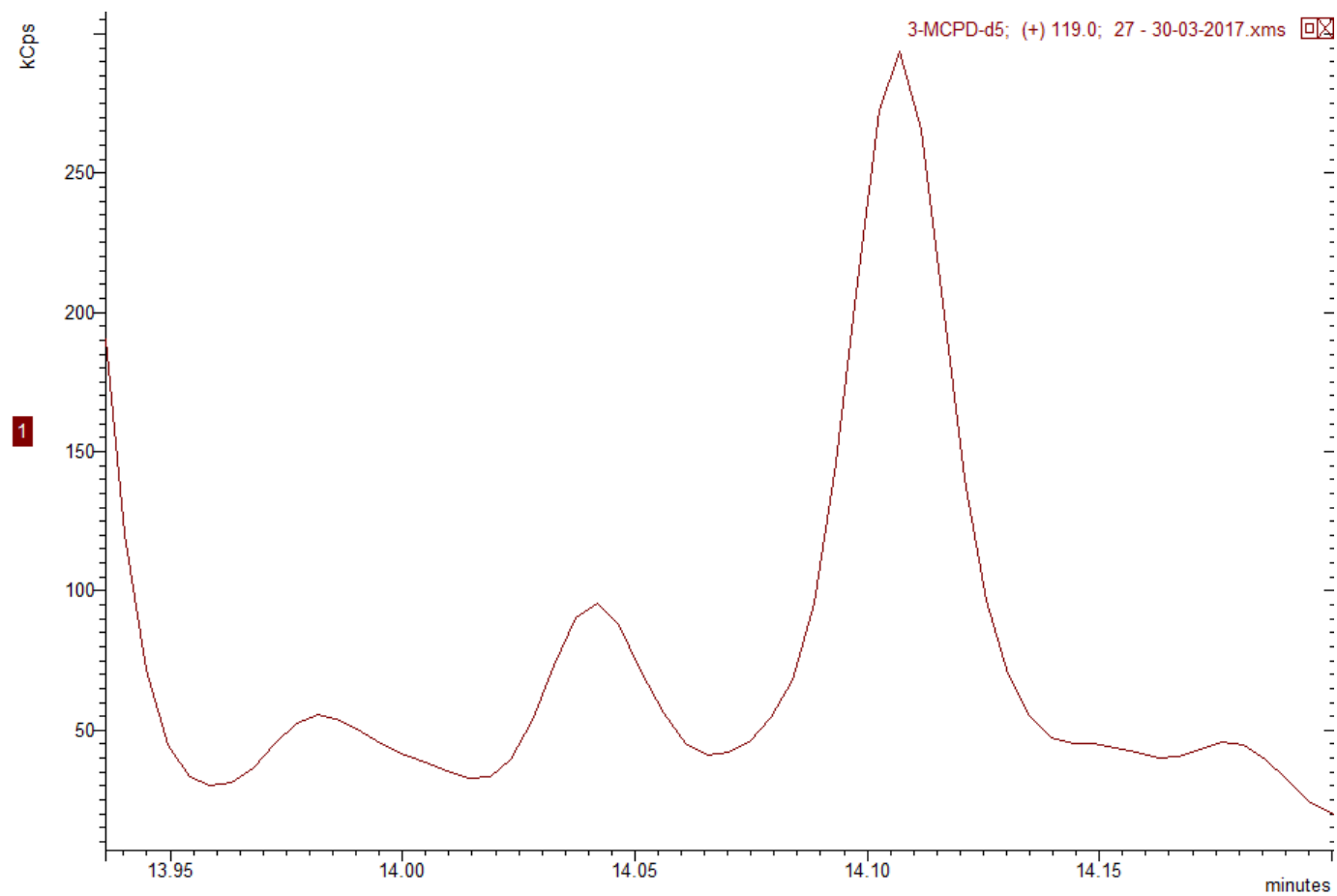


Figura B 117-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com cloro - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 118-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacao metade com metade do óleo de palma - ião119**

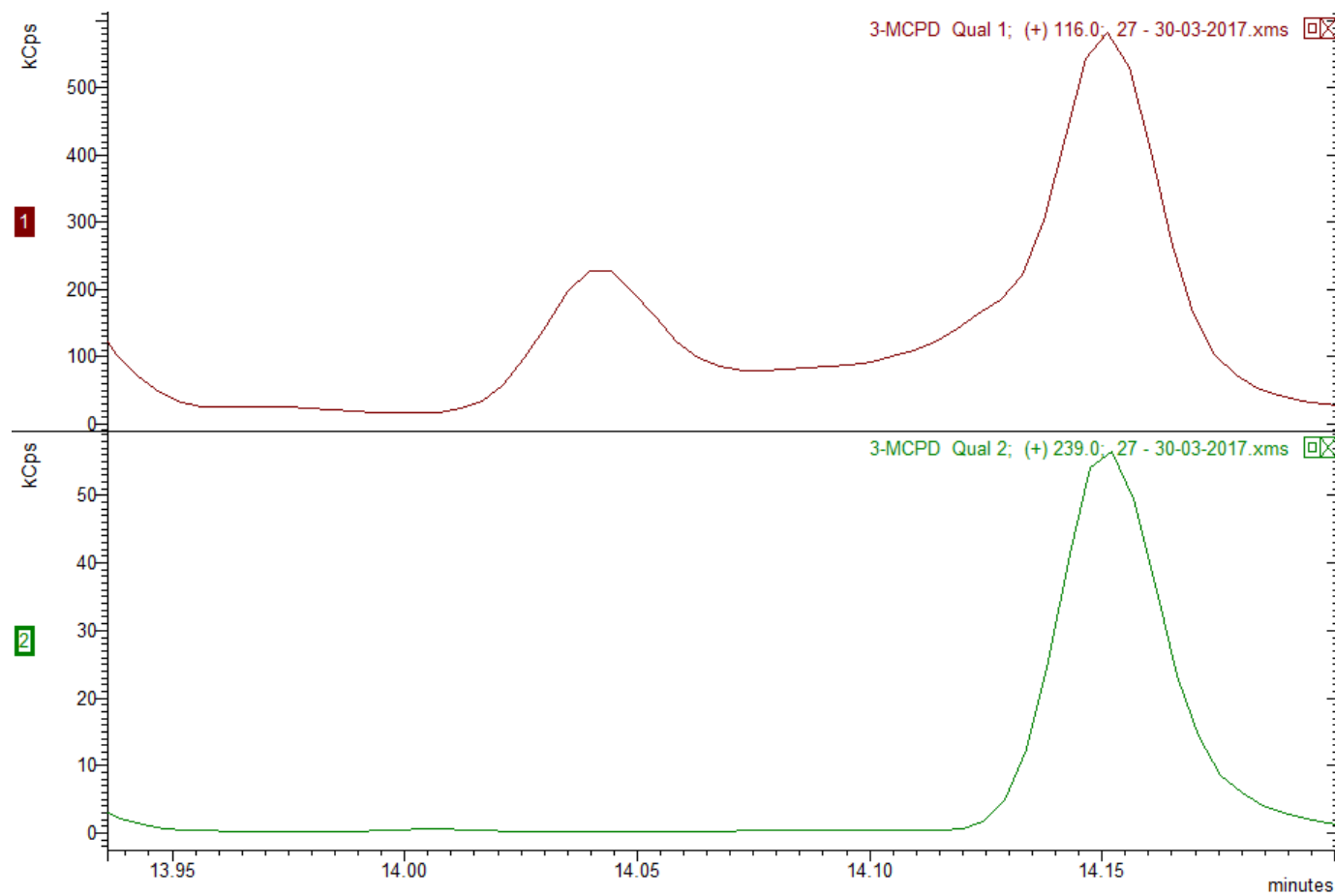


Figura B 119-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com metade de óleo de palma - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

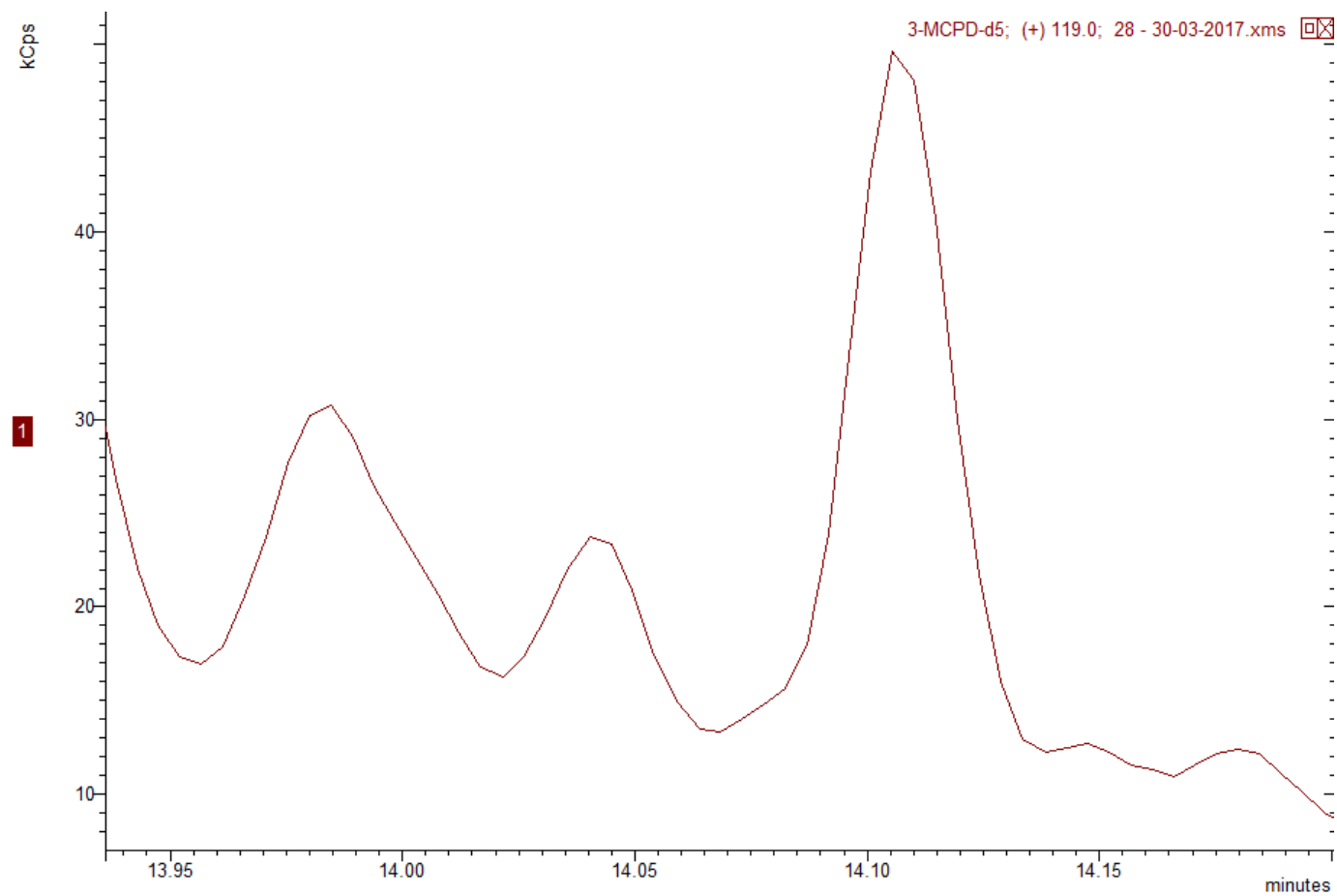


Figura B 120-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacao sem colco mono-ião119

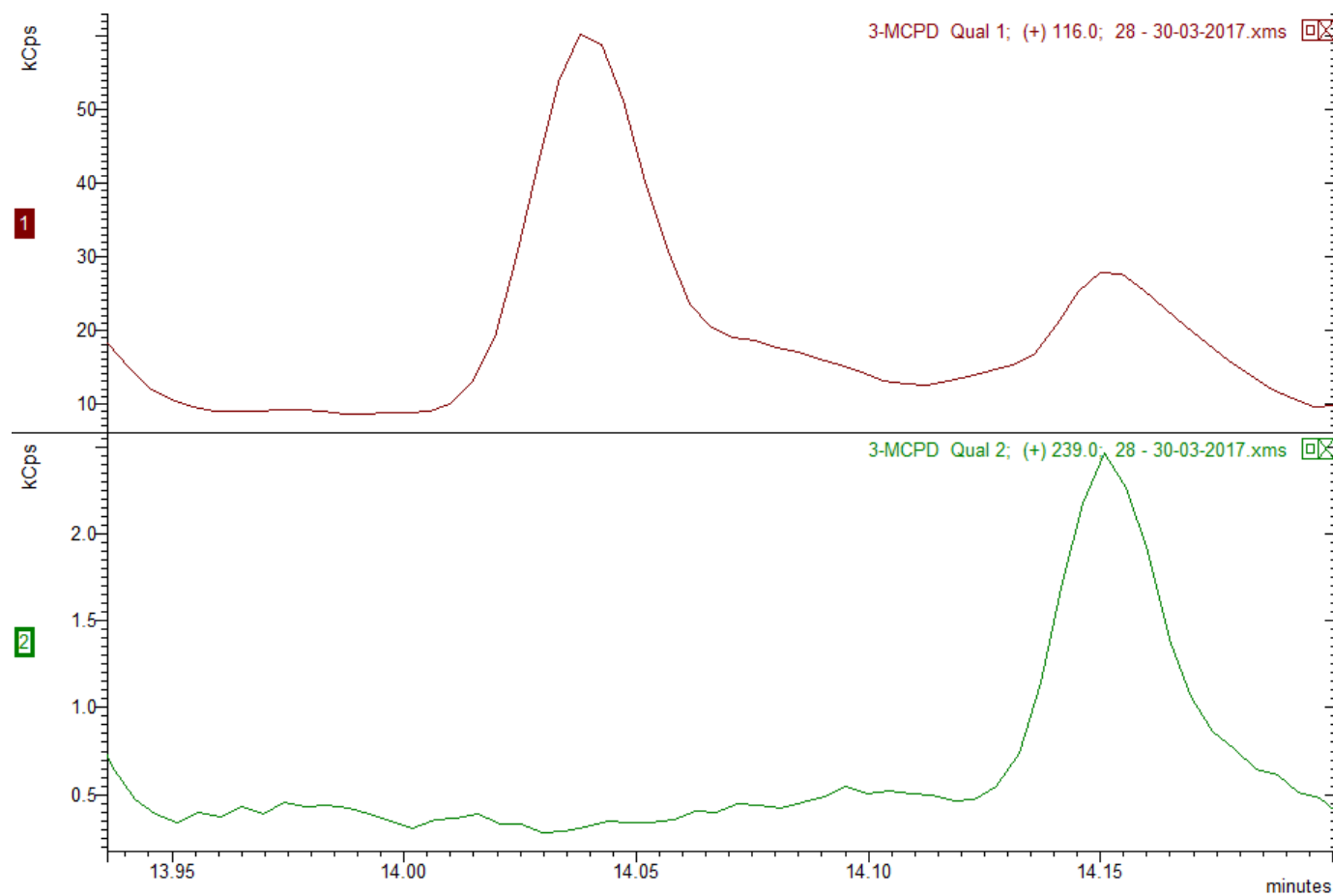
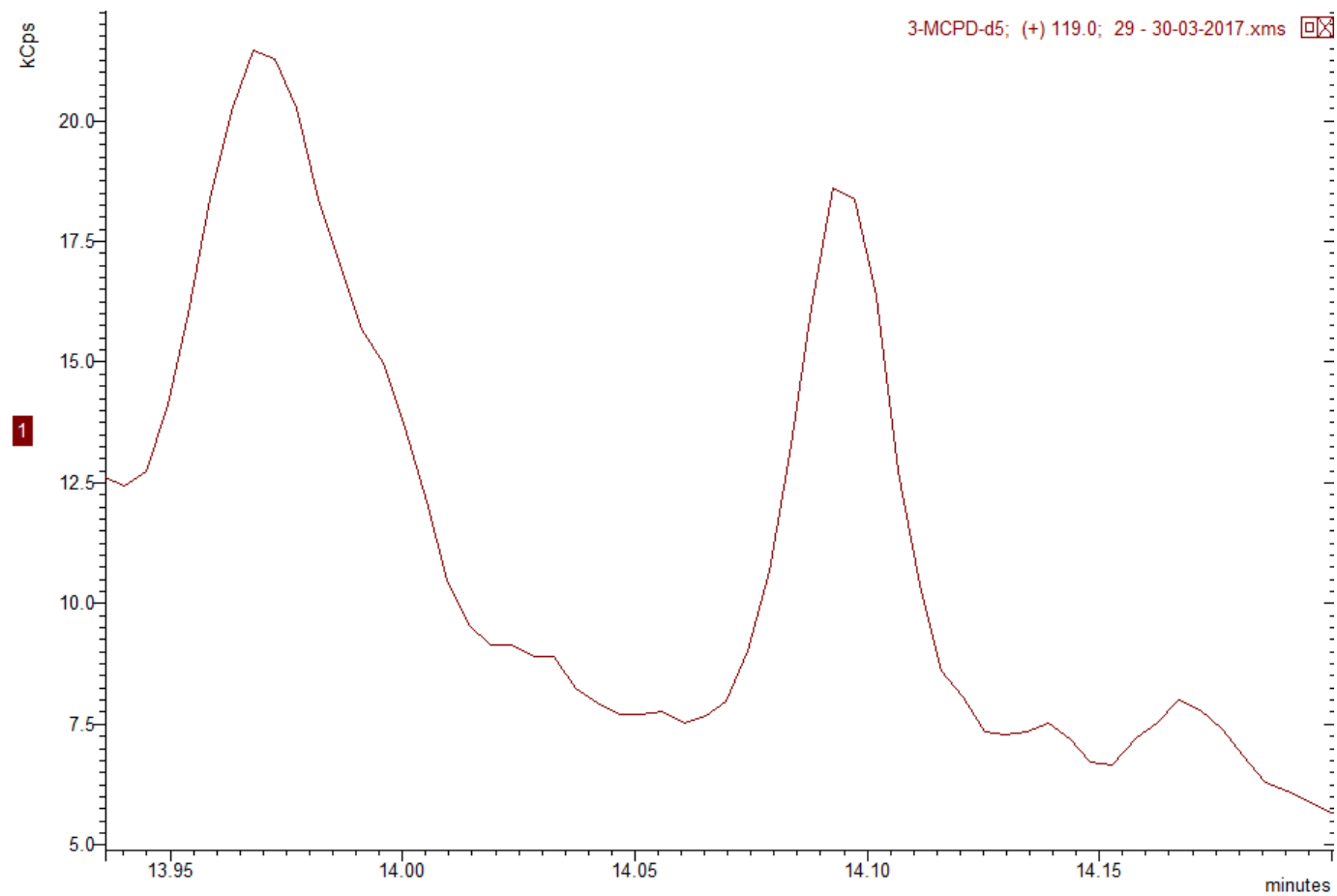


Figura B 121-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau sem colco mono - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 122--Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau com água destilada-ão119**



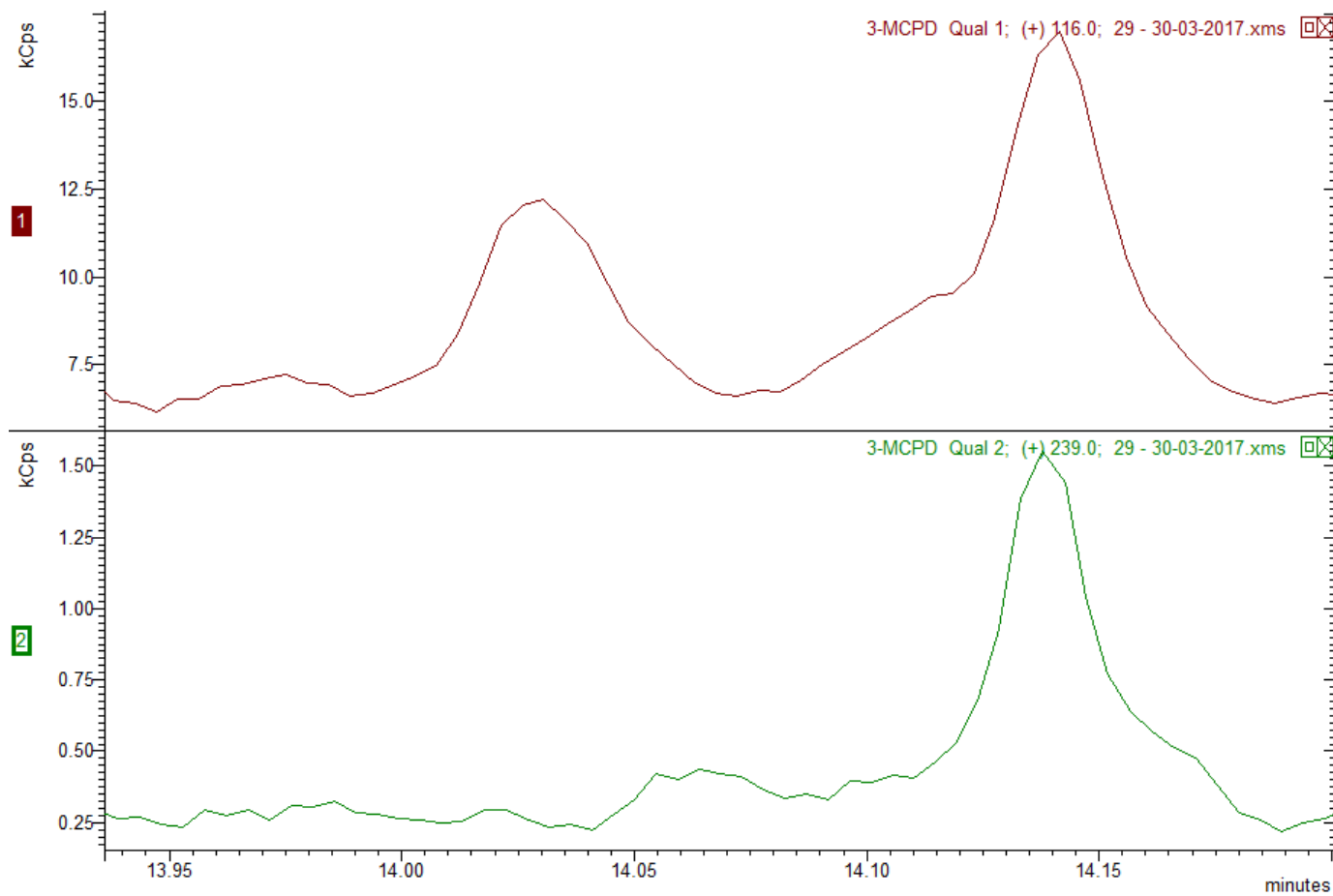


Figura B 123-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com água destilada - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

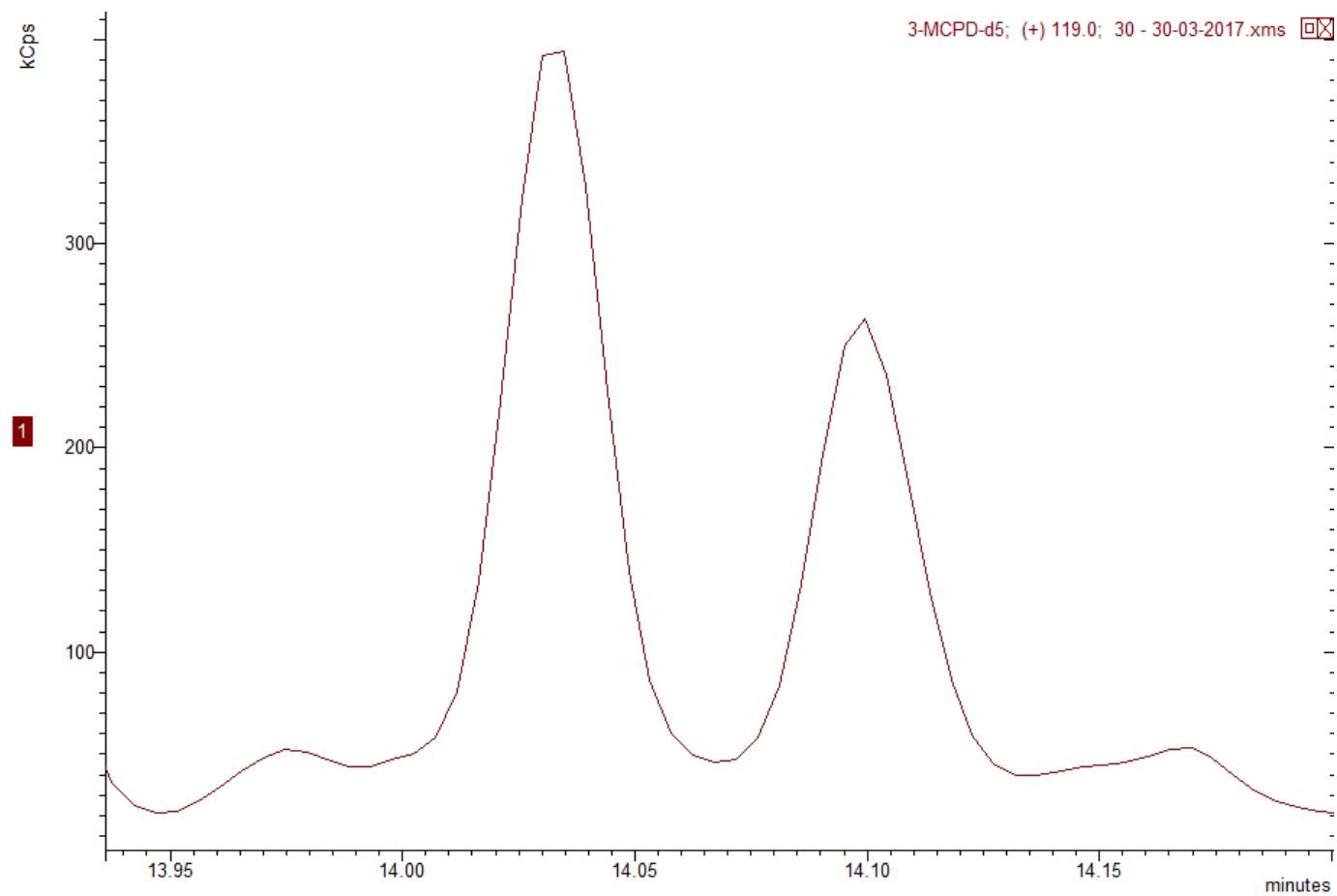


Figura B 124-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacao com mínimo de óleo desmoldante-iao119

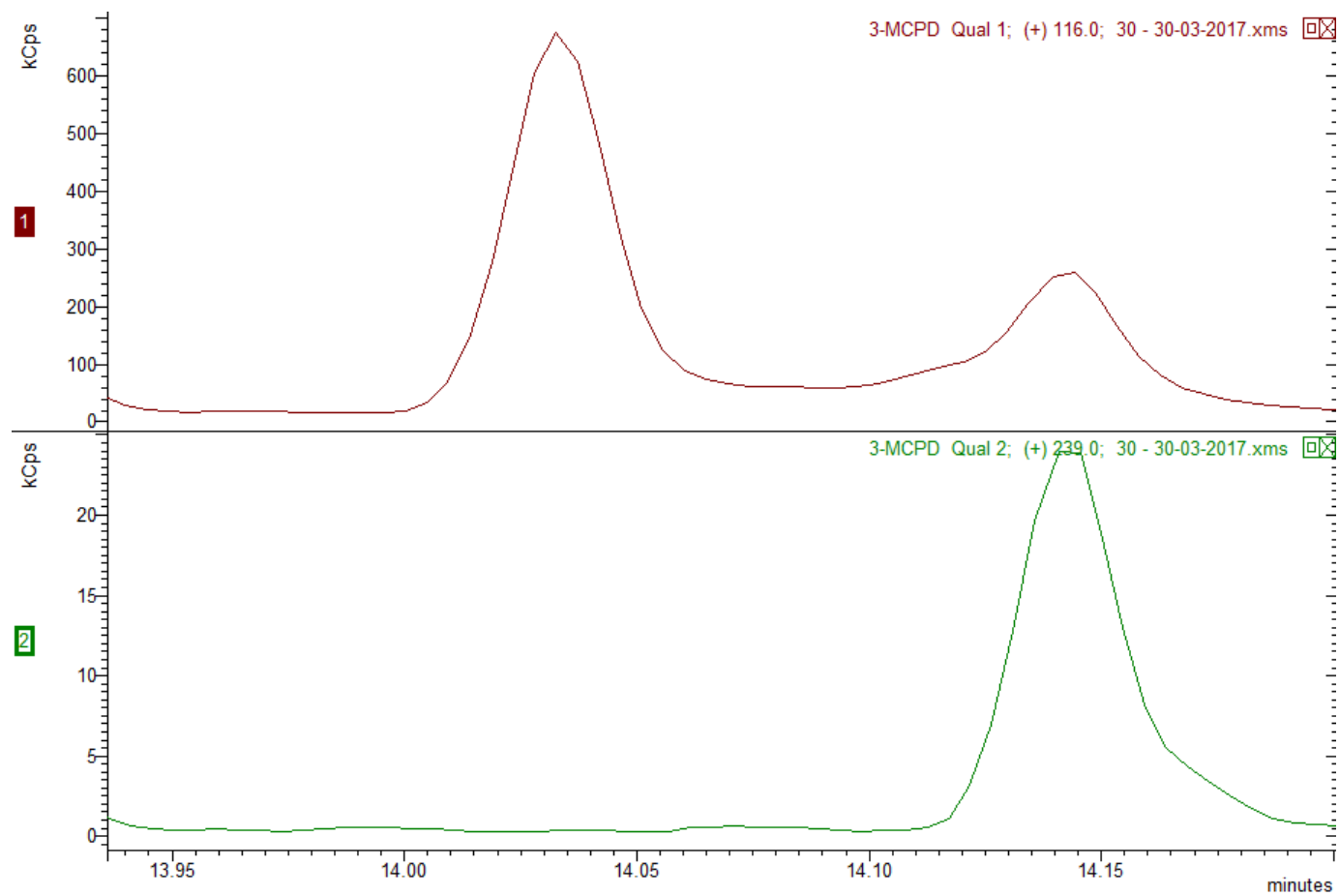
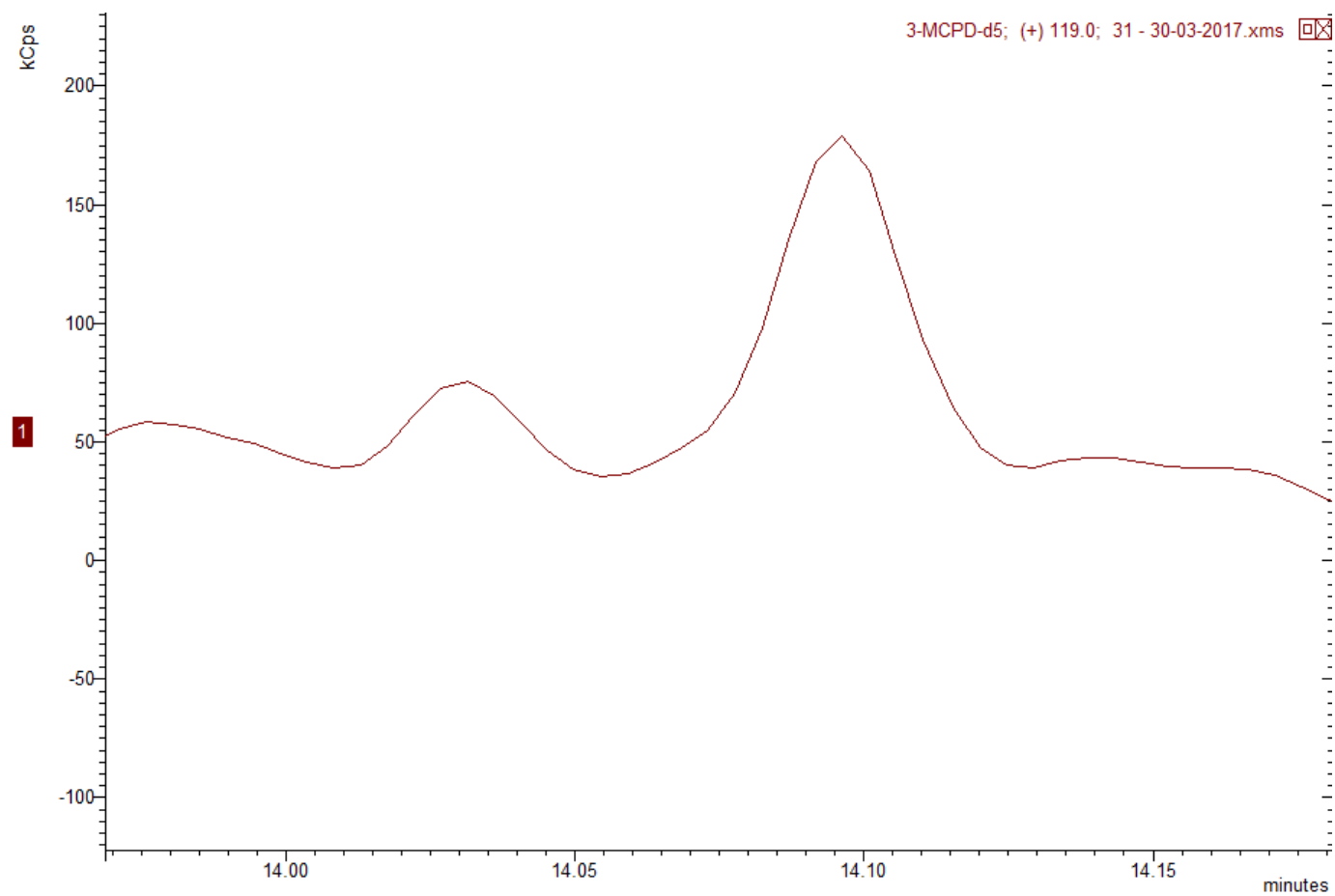


Figura B 125-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com mínimo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 126-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau com triplo de óleo desmoldante-ião119**

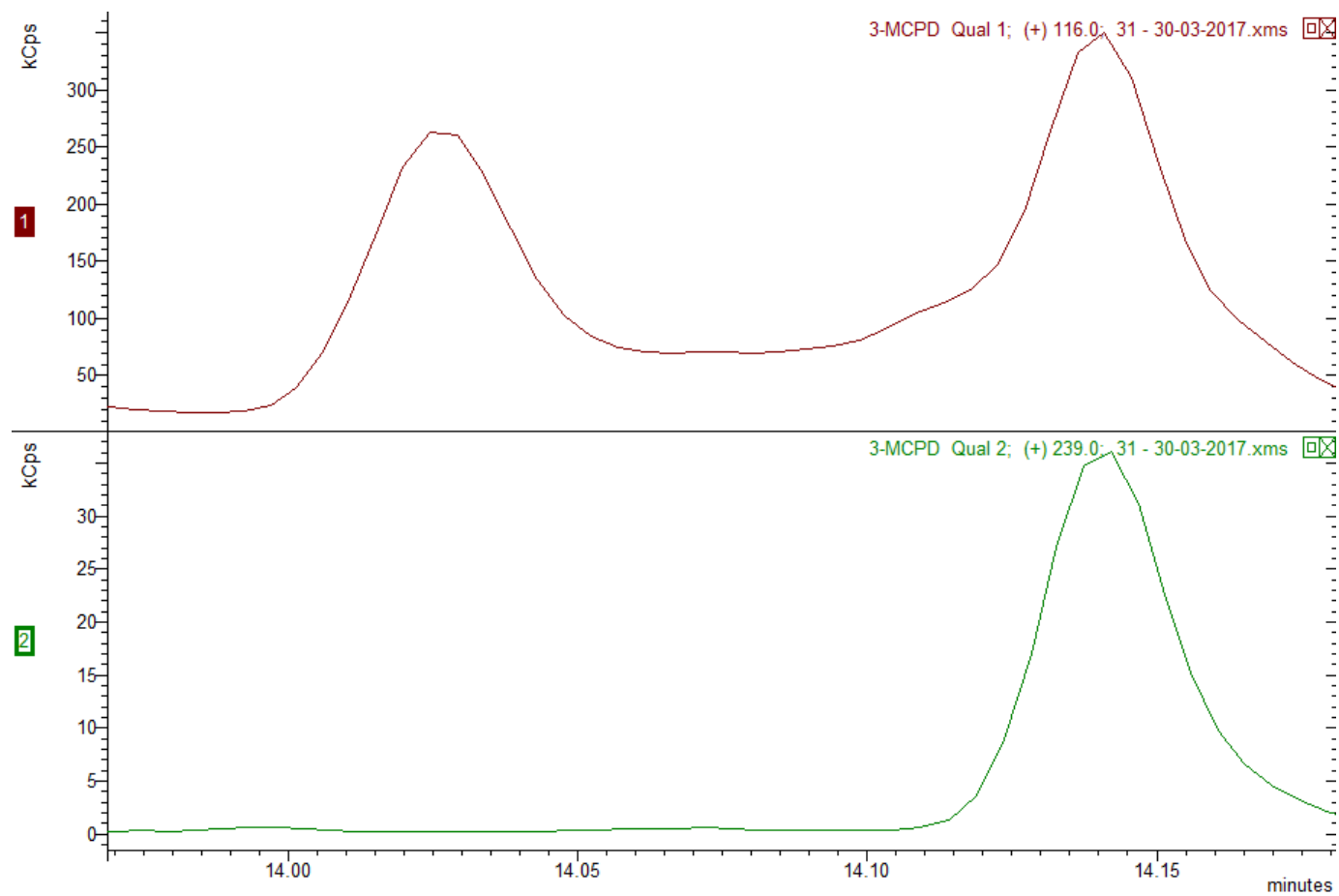


Figura B 127-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau com triplo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

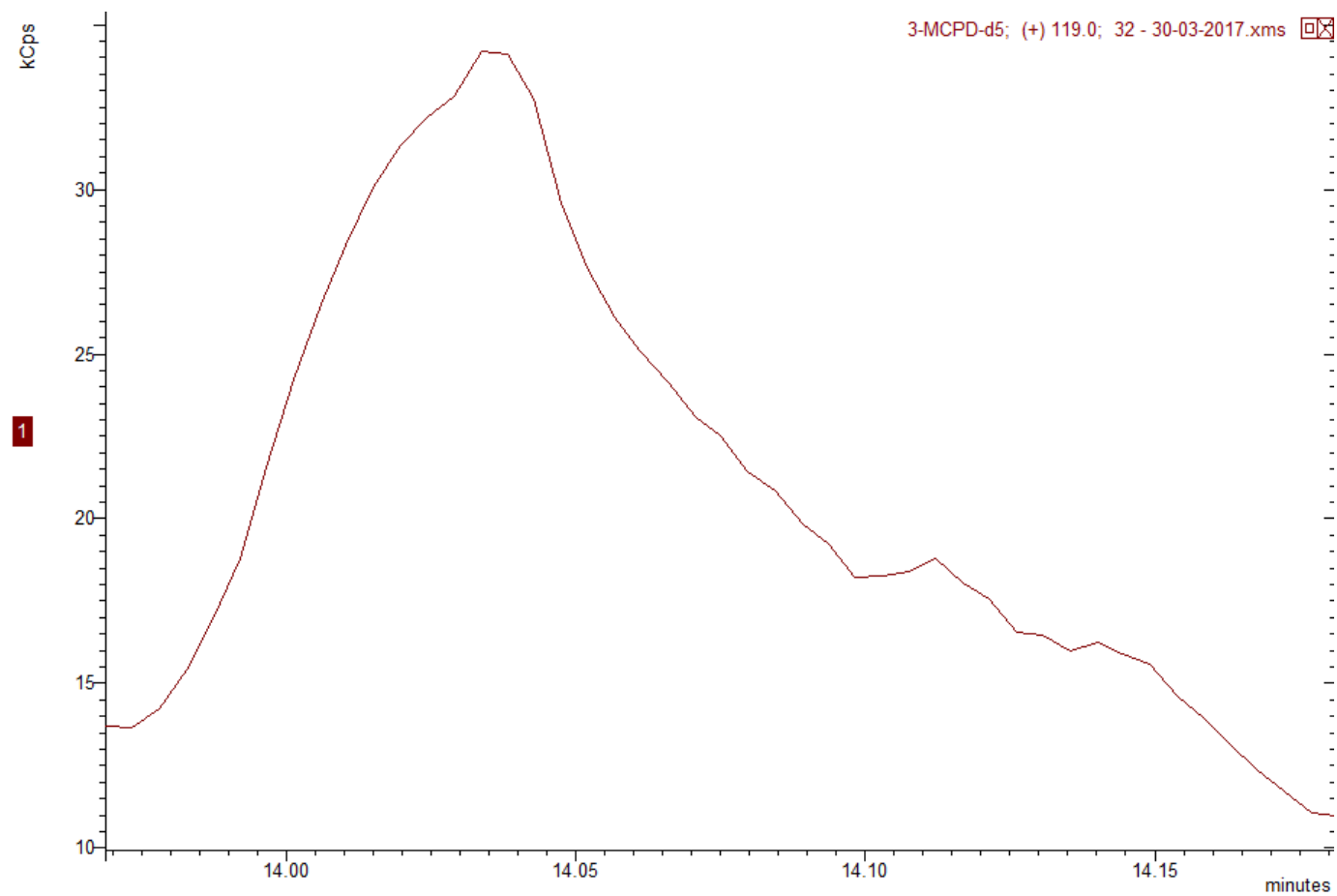


Figura B 128-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau sem glicerina-ão119

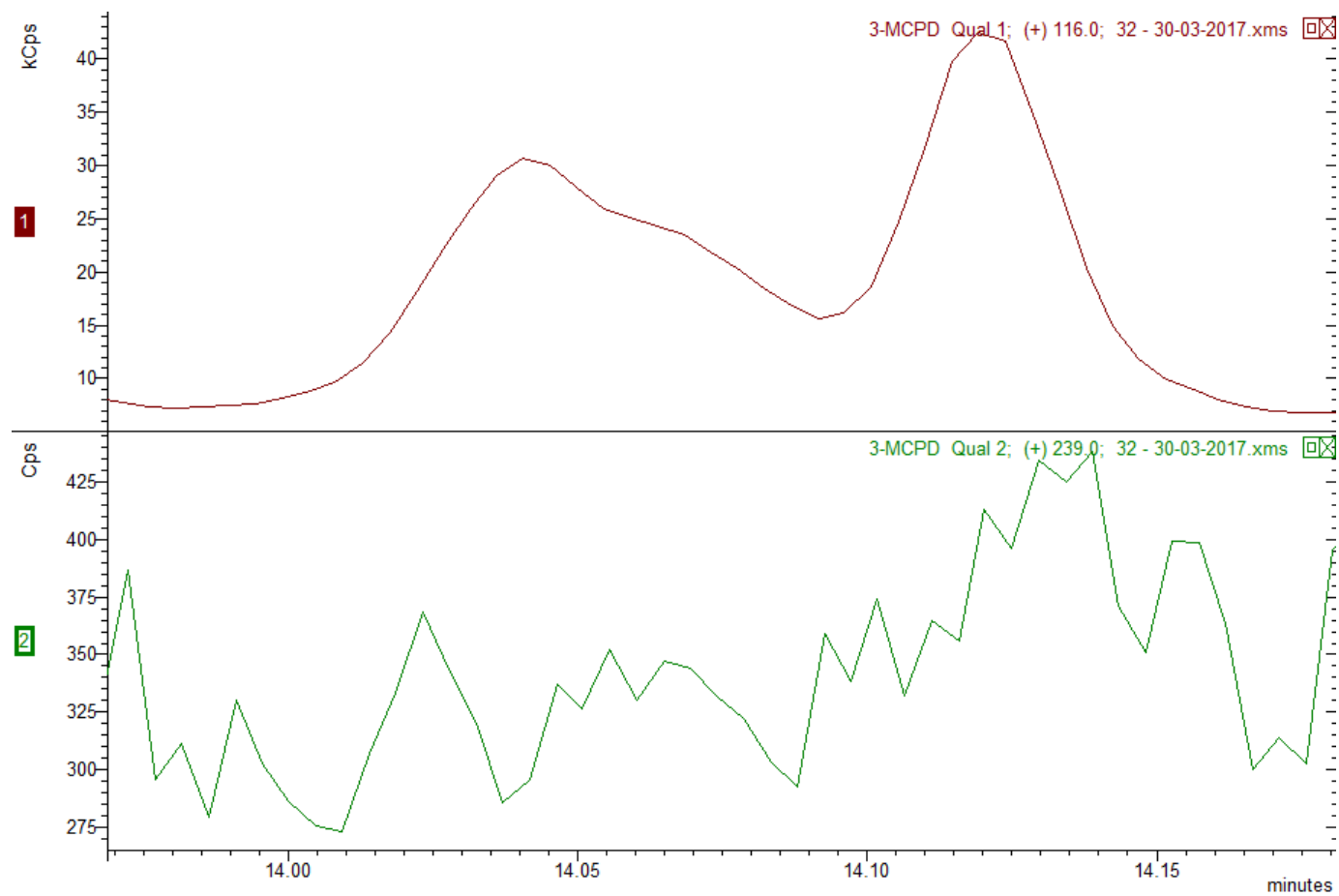
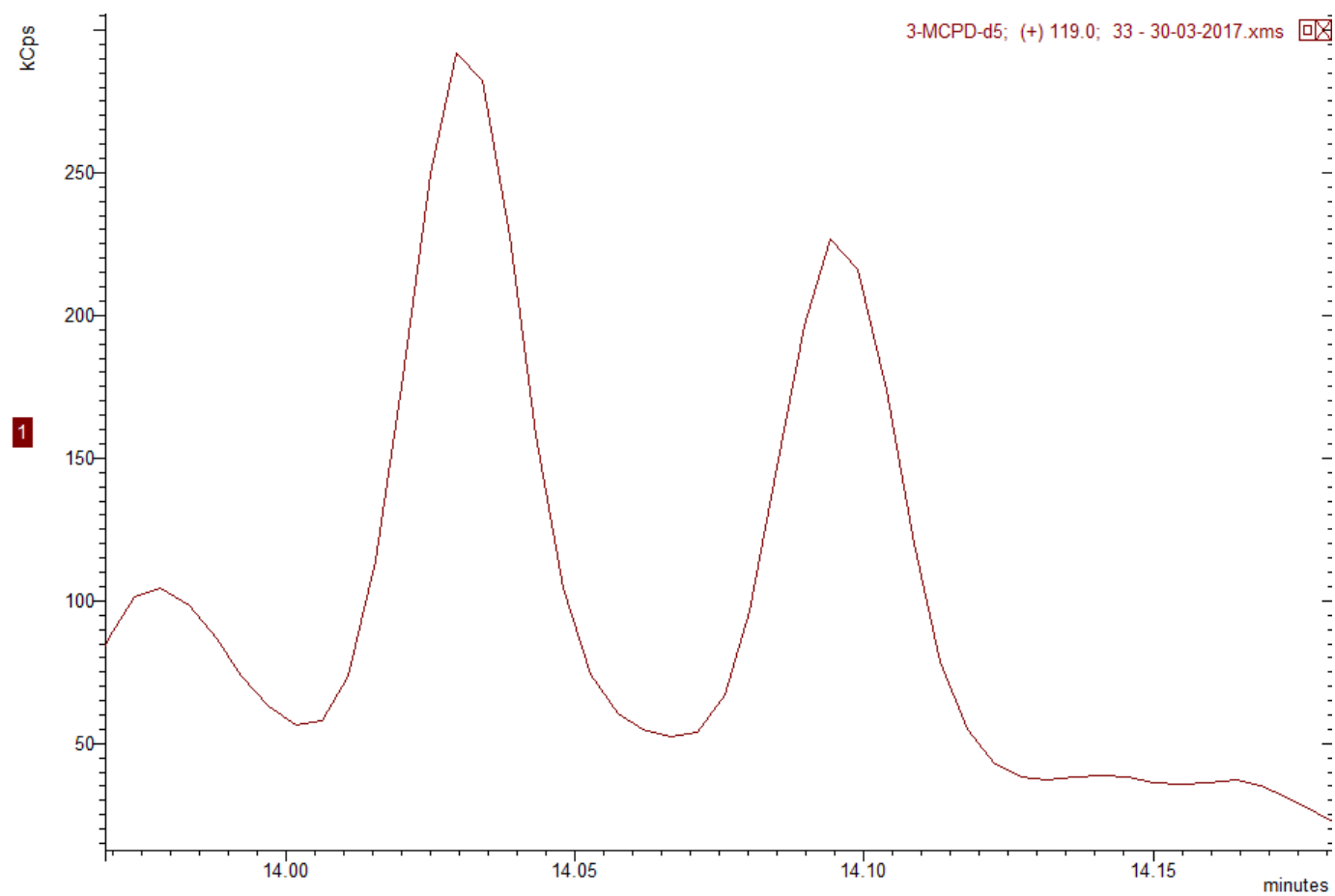


Figura B 129- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau sem glicerina- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 130-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau fornecedor de farinha Granel-ião119**



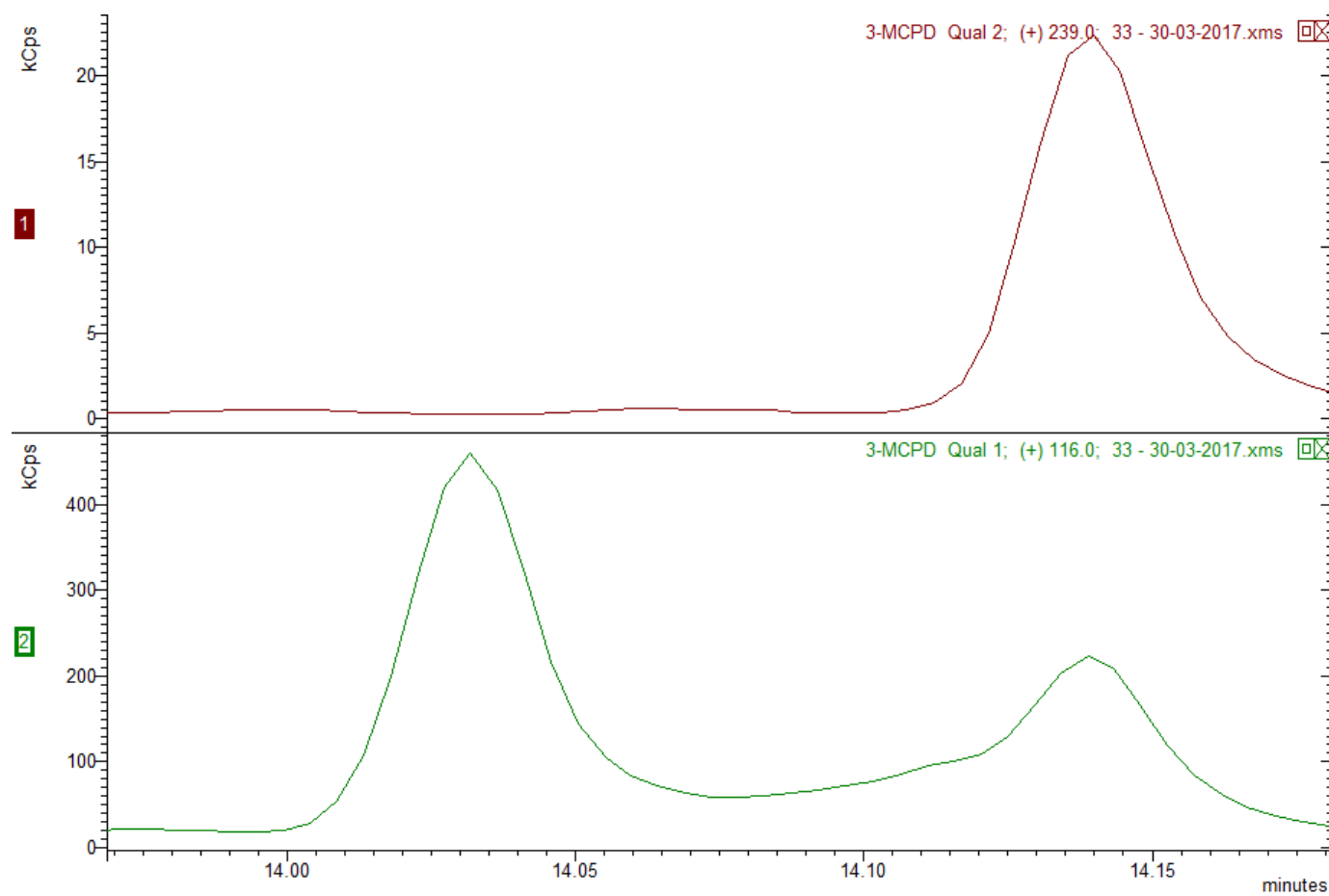


Figura B 131-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau fornecedor de farinha Granel- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239

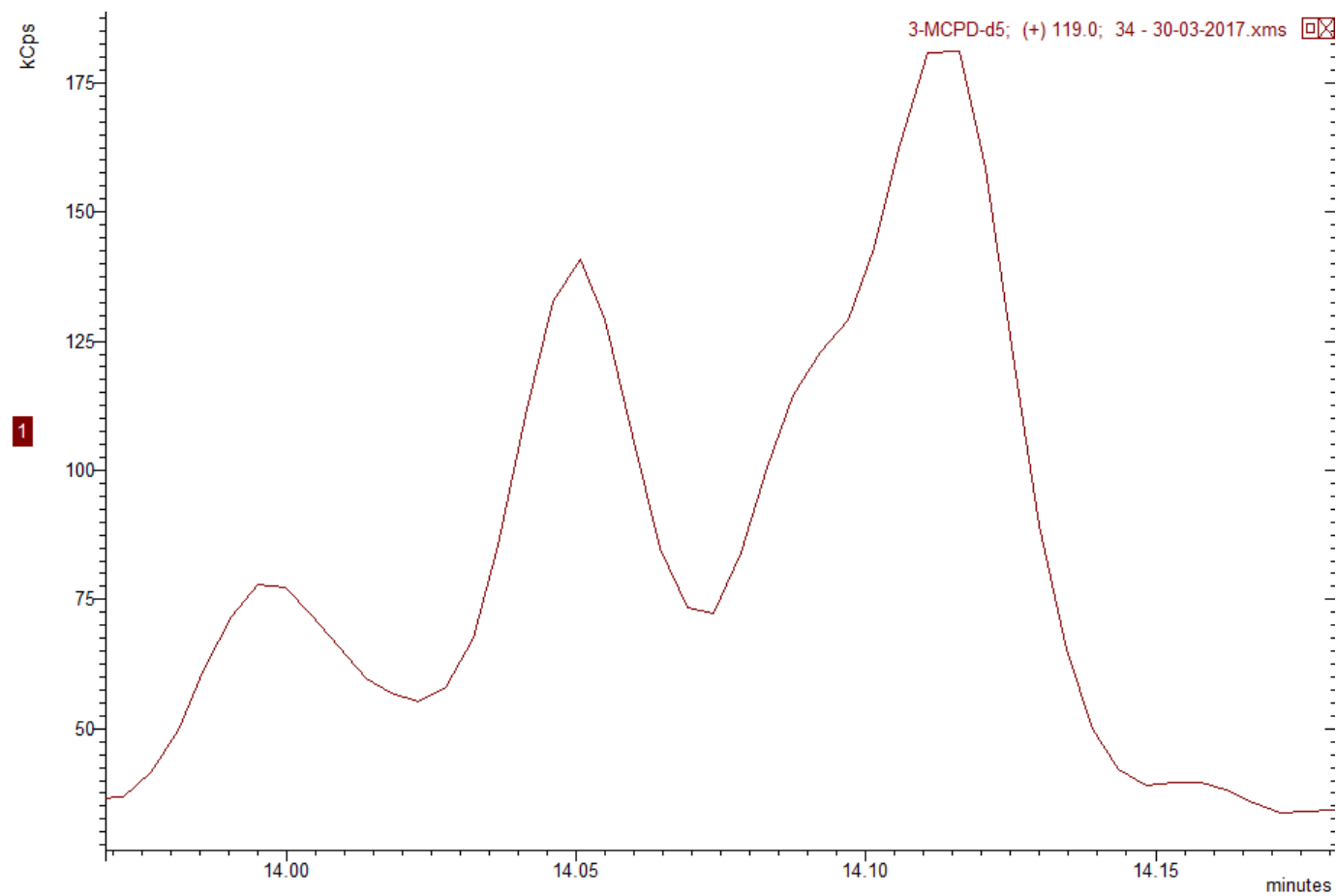


Figura B 132-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacau Standart -ião119

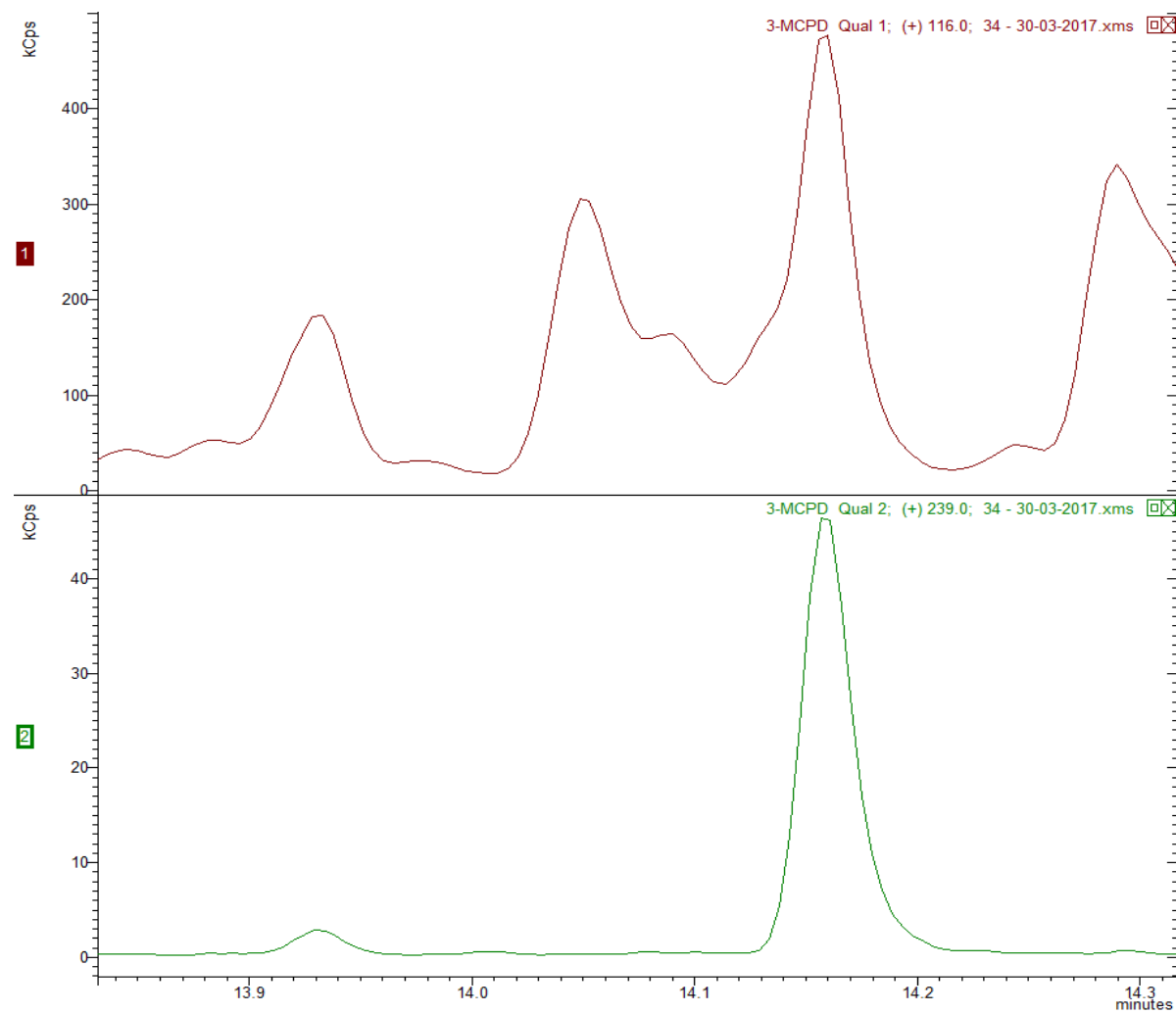
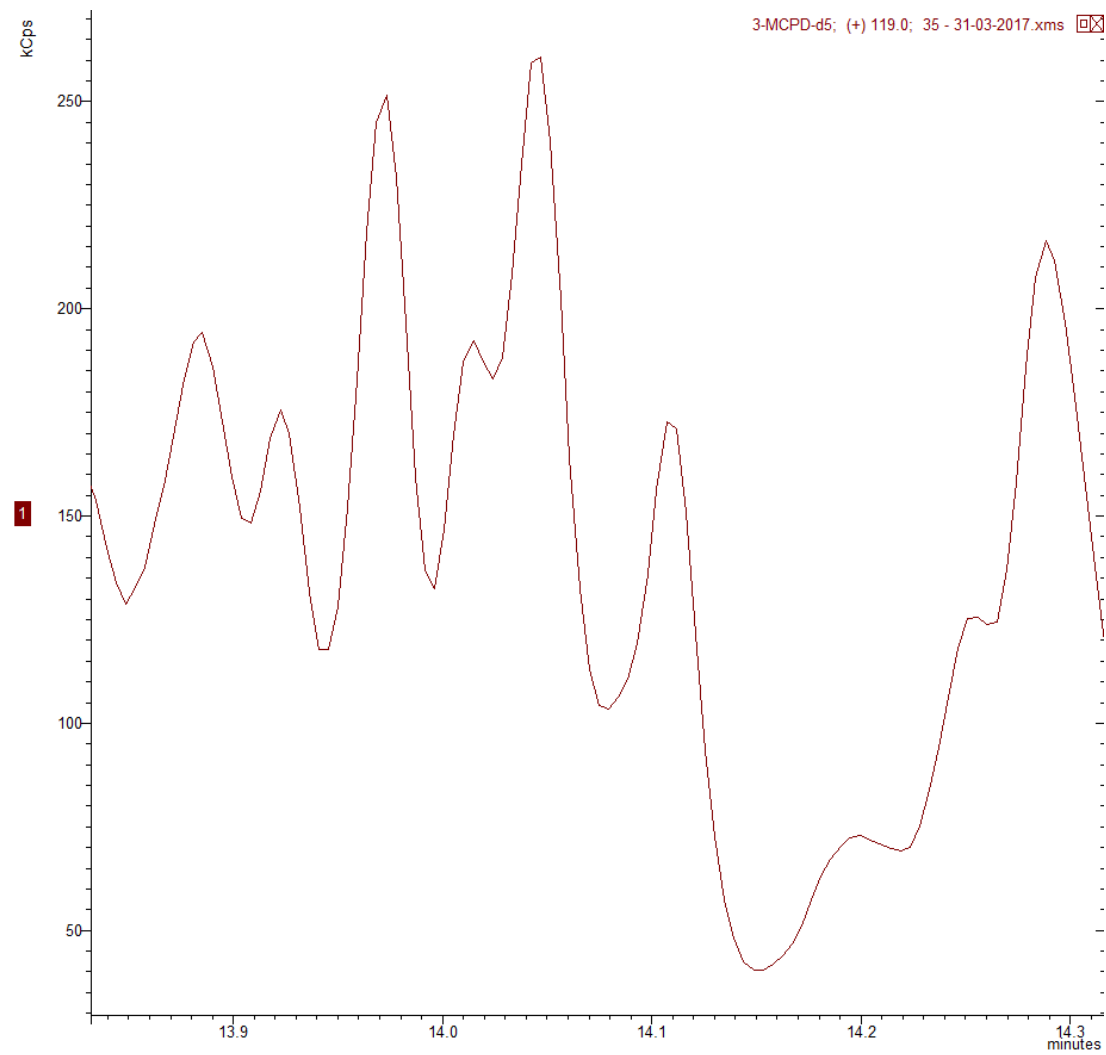
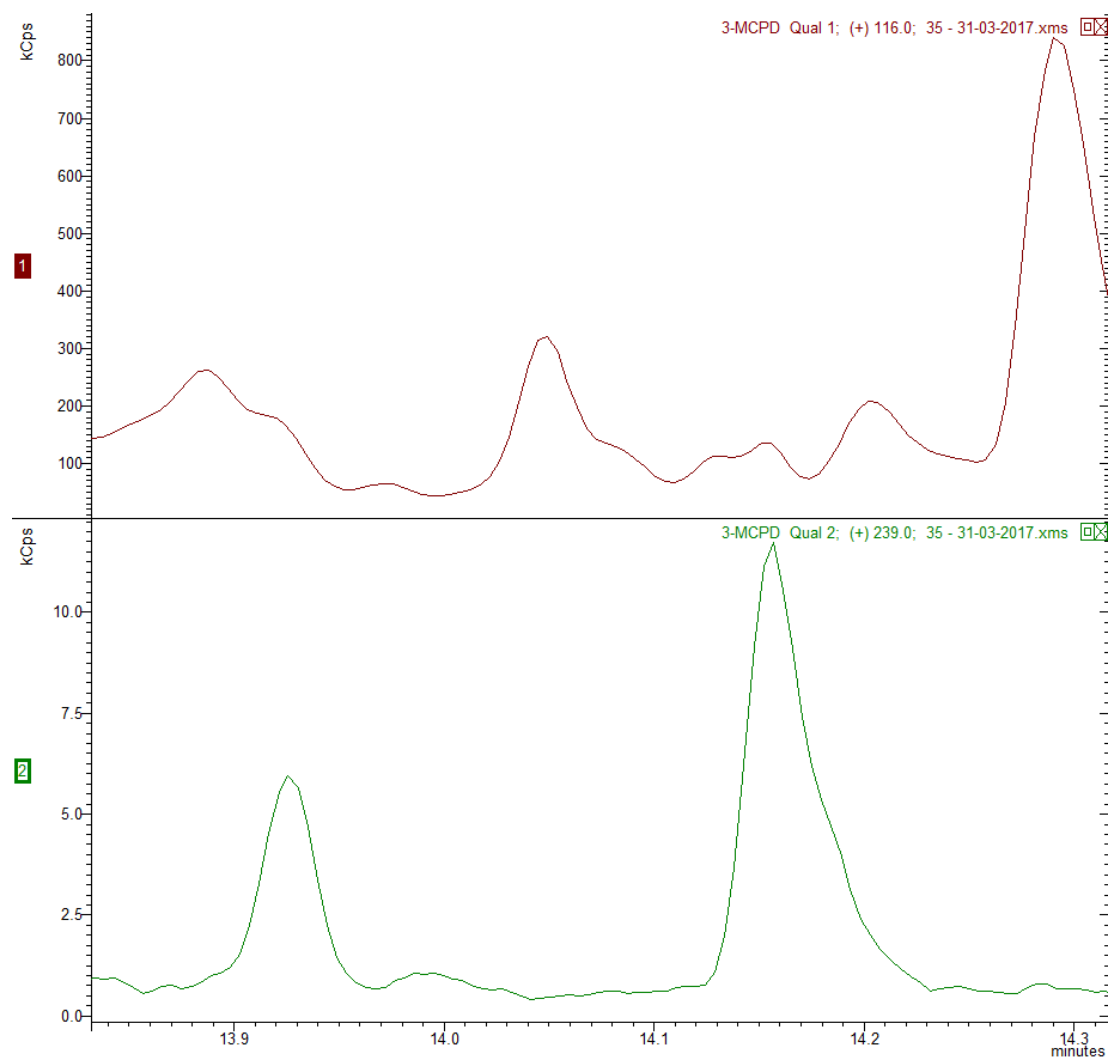


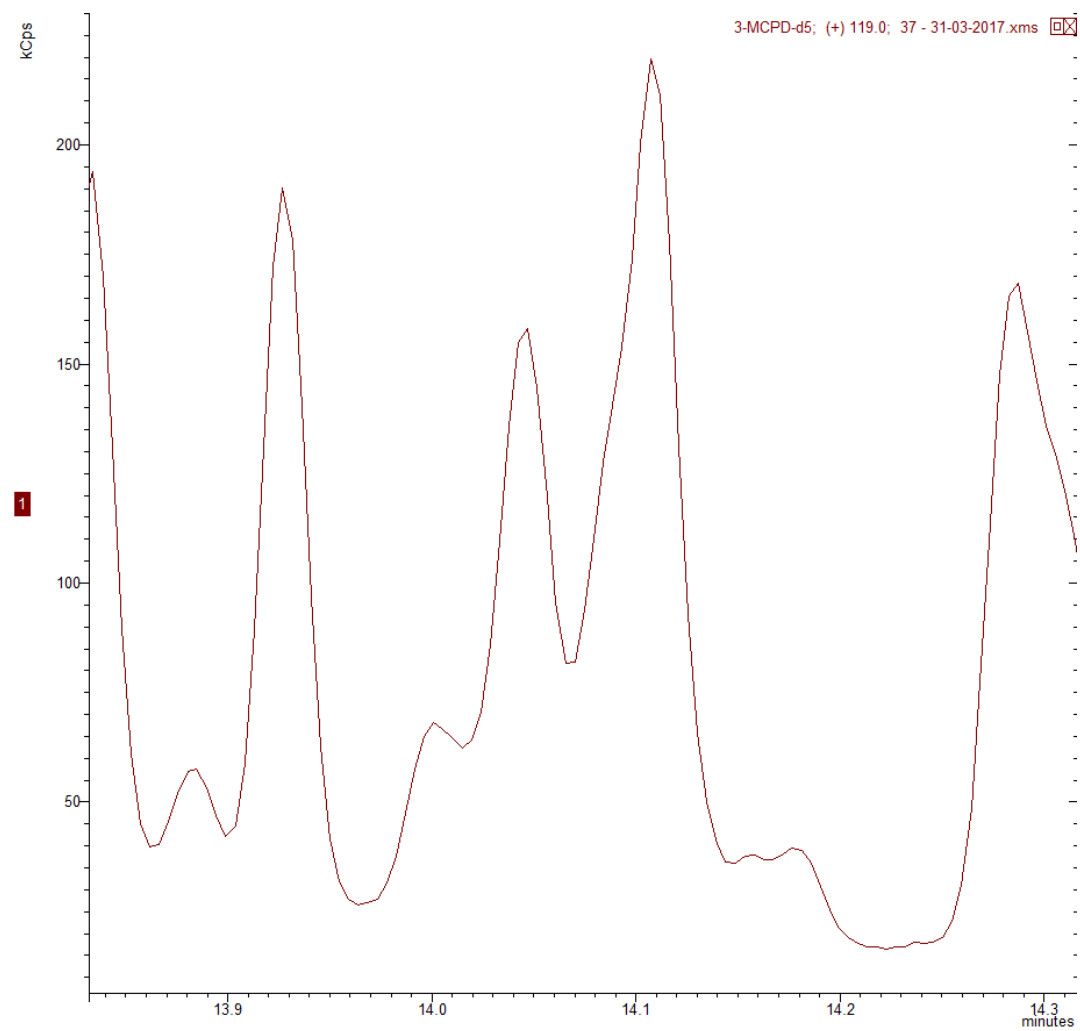
Figura B 133-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacau Standart- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



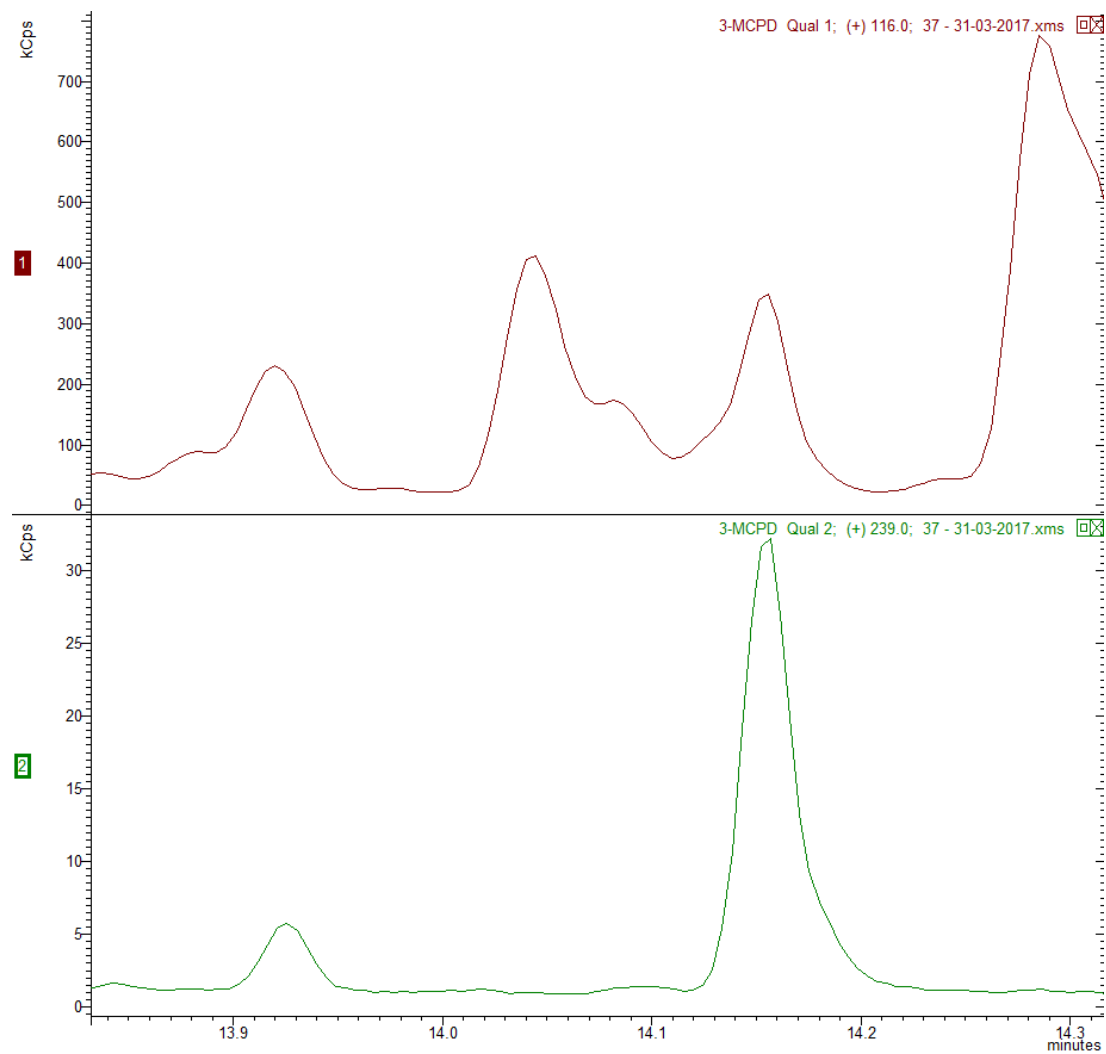
**Figura B 134-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Cacao dobro do sal -ião119**



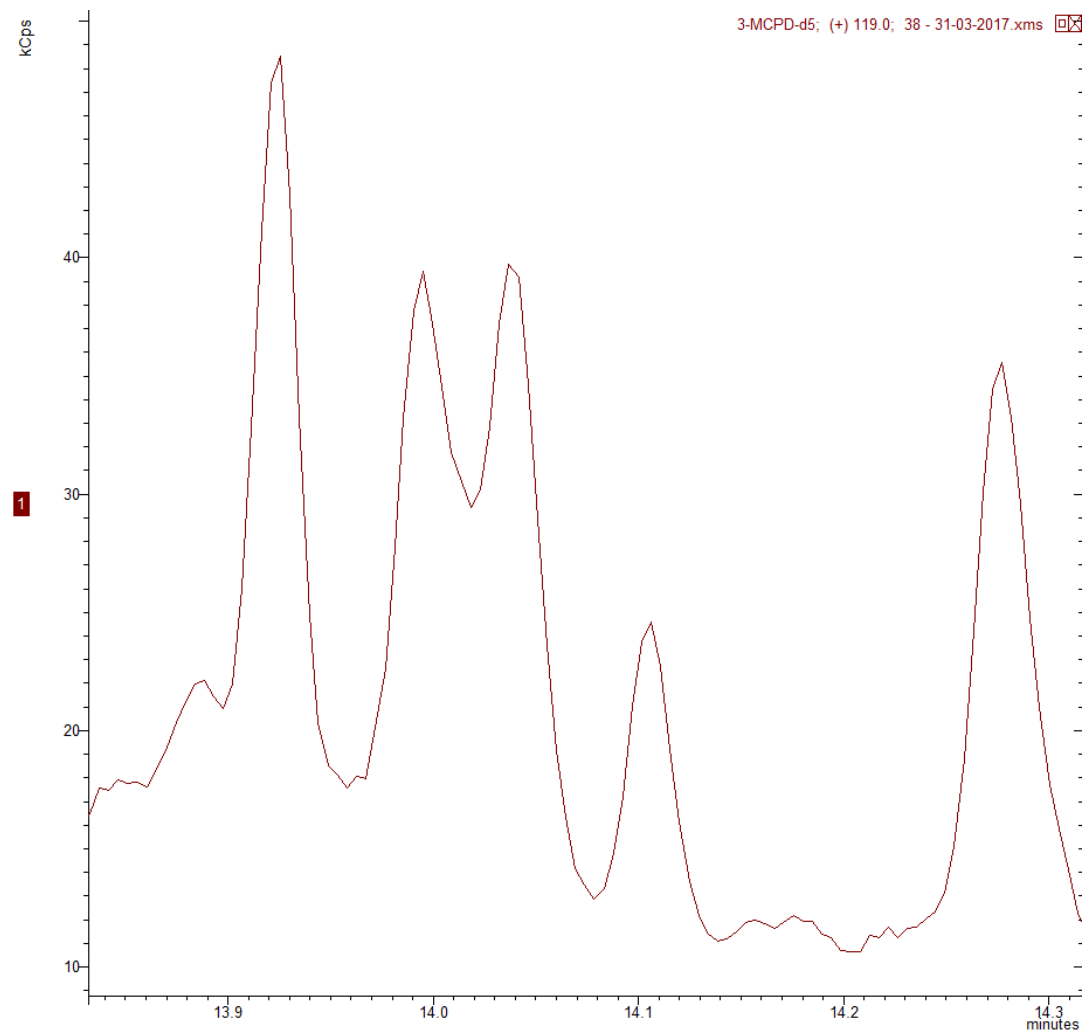
**Figura B 135-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Cacao dobro do sal- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**



**Figura B 136-Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Mármore com cloro -ião119**

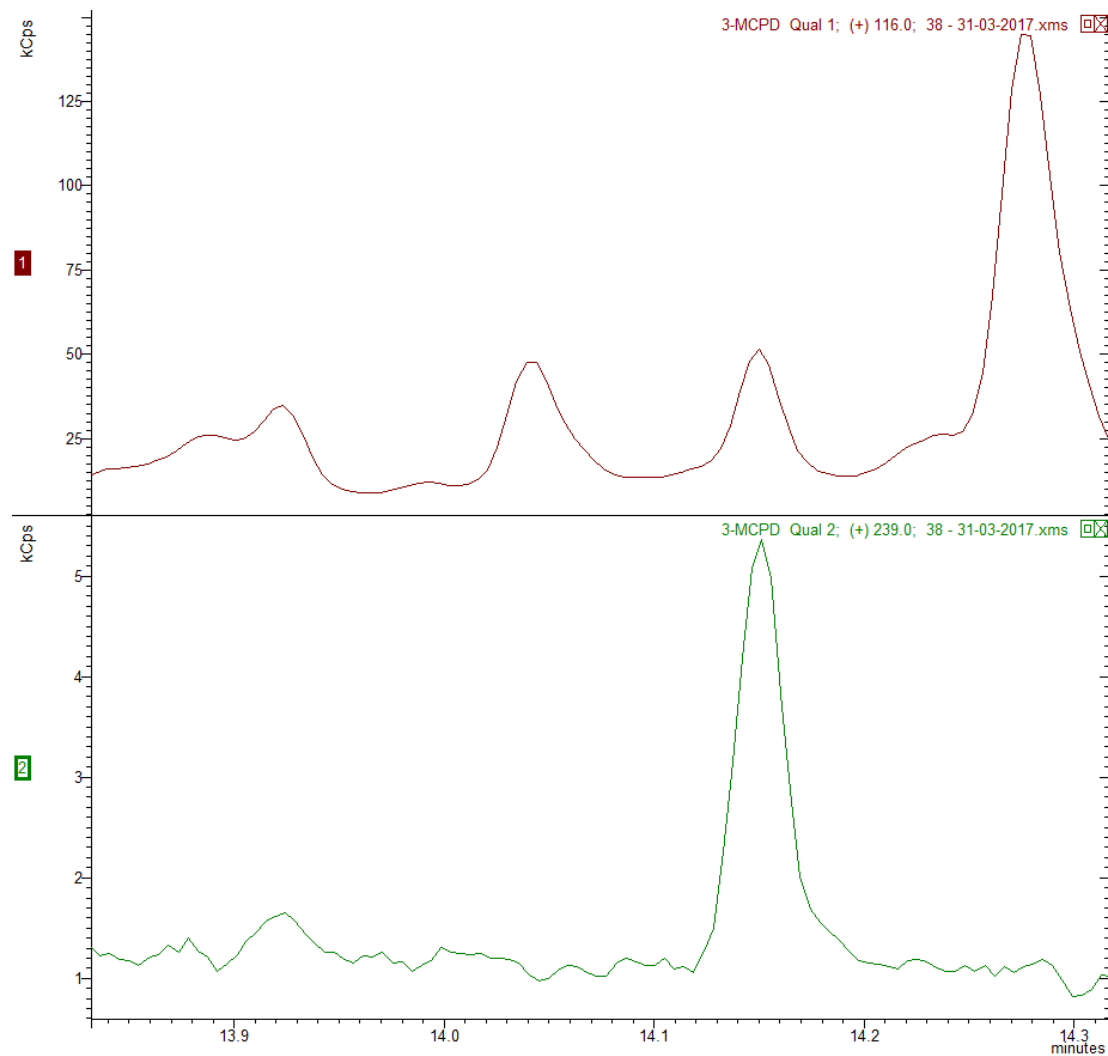


**Figura B 137-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com sal- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**

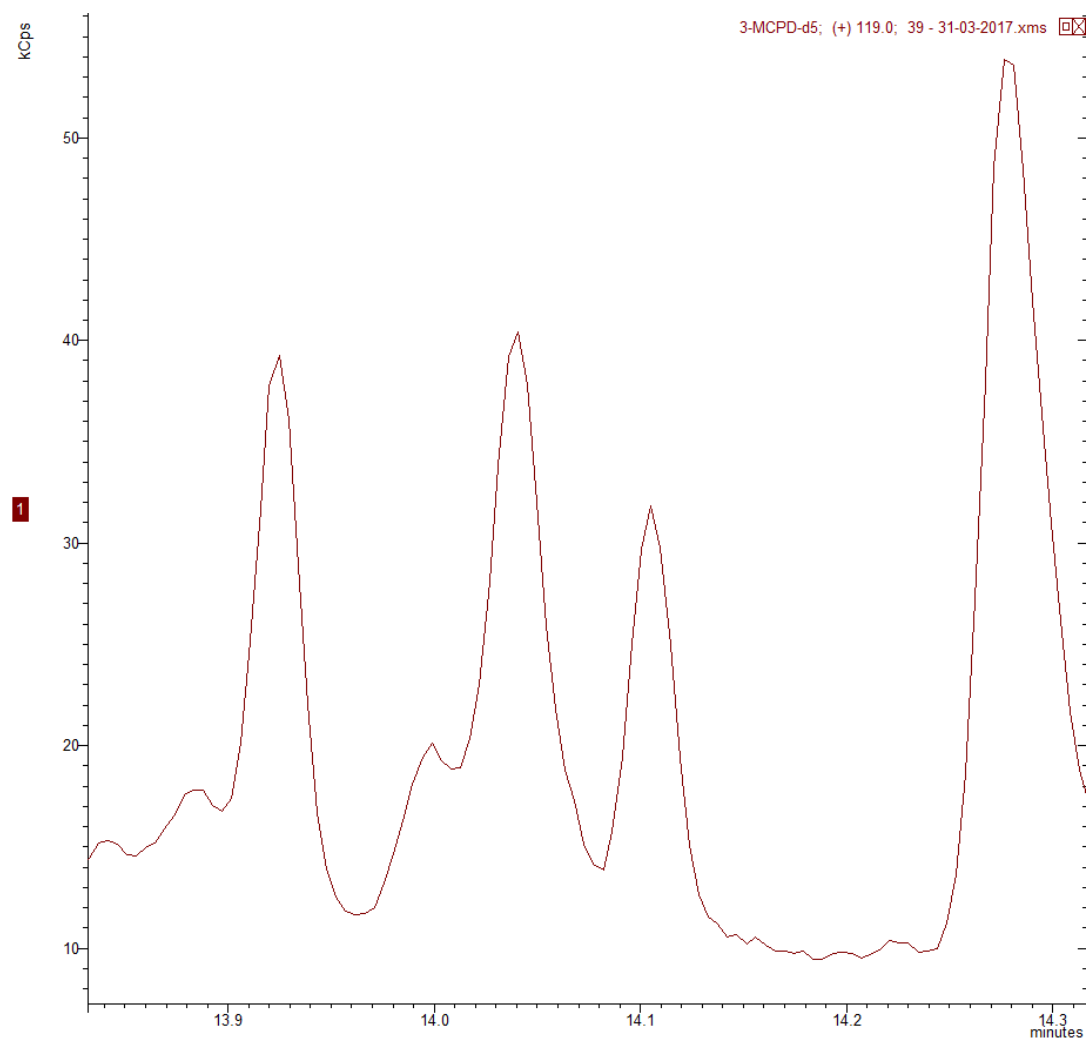


**Figura B 138- Cromatograma TIC de 3-MCPD-d5 da receita de Mármore sem óleo de palma -ião119**





**Figura B 139- Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem óleo de palma- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**



**Figura B 140-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem colco mono- ião 119**

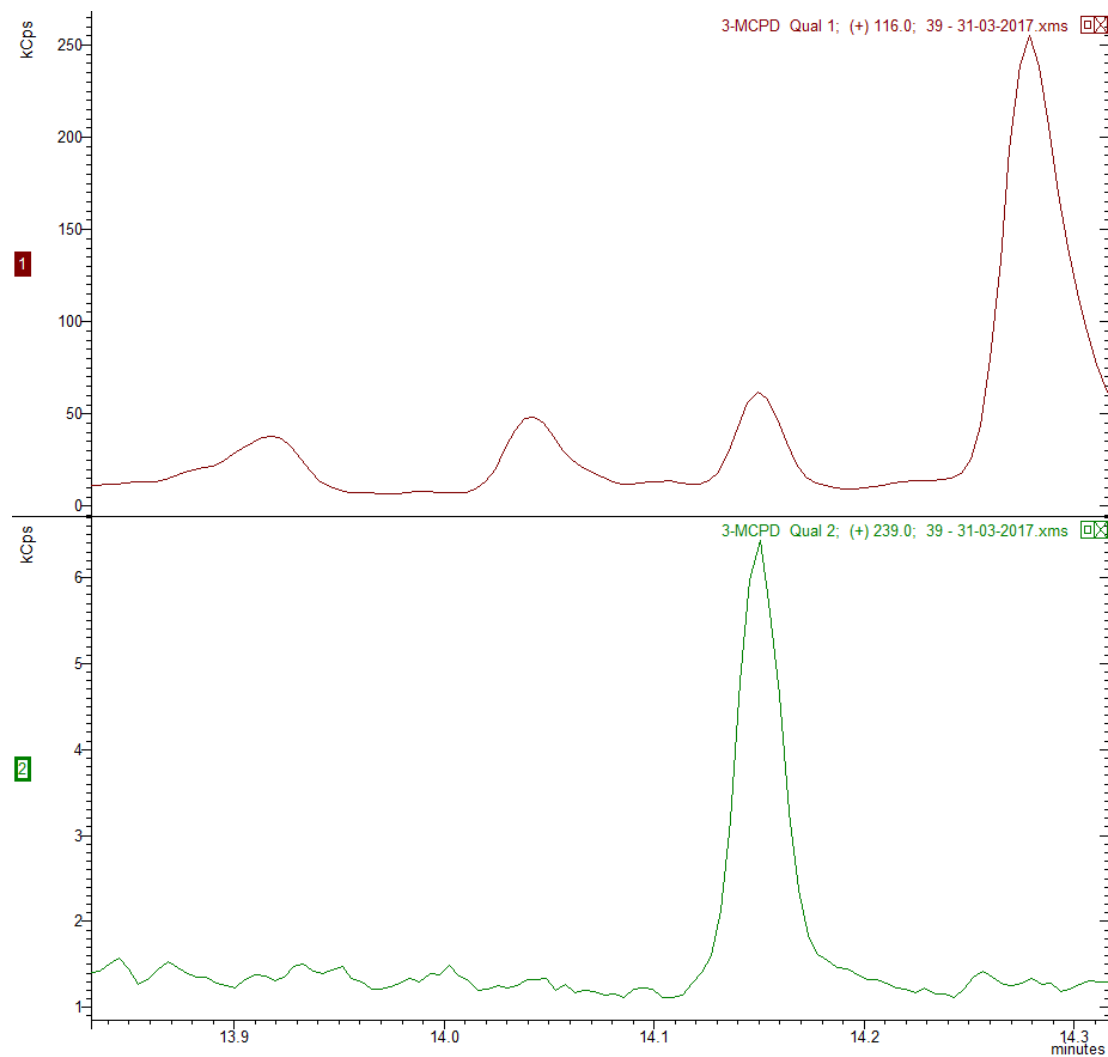
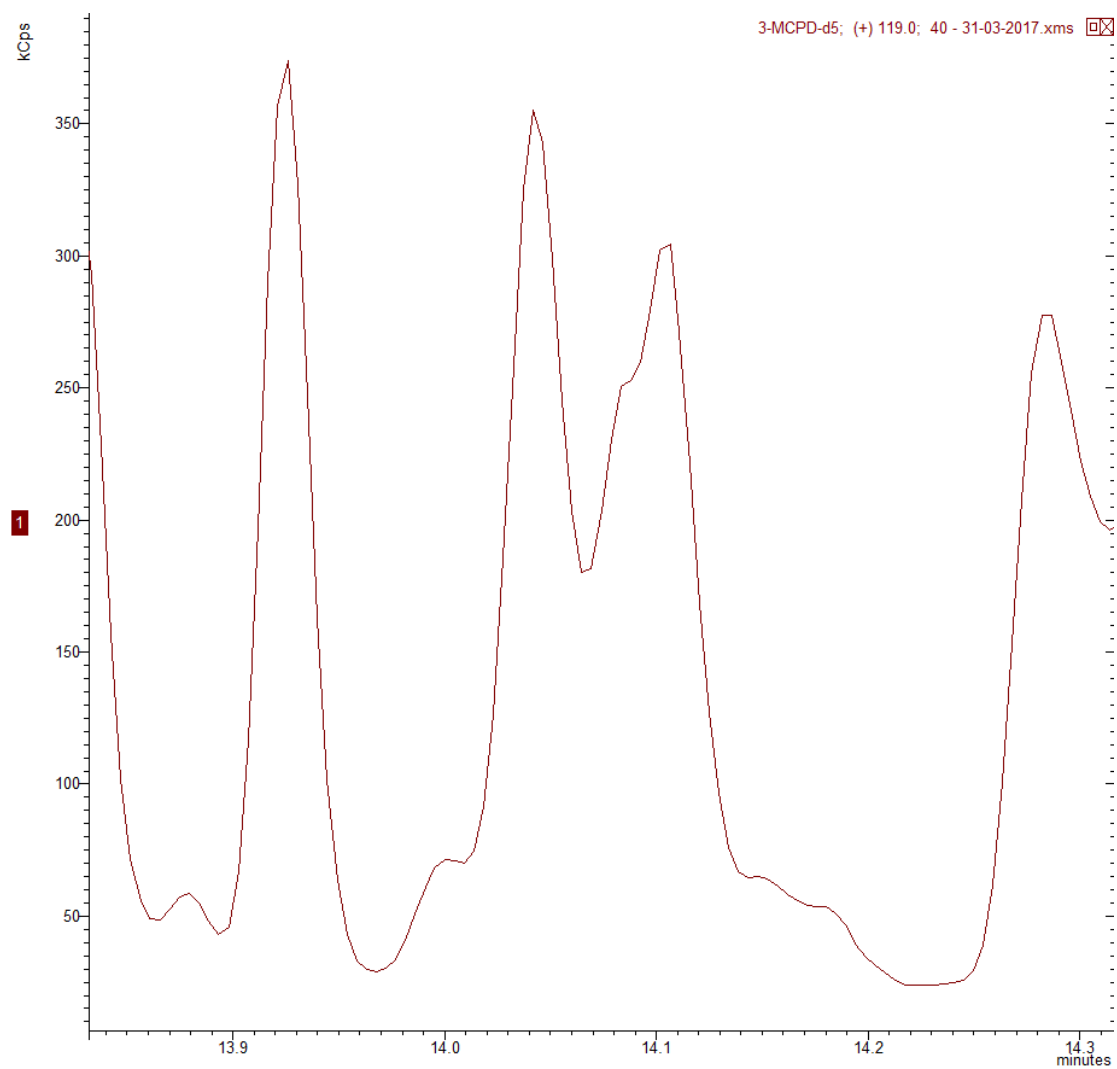
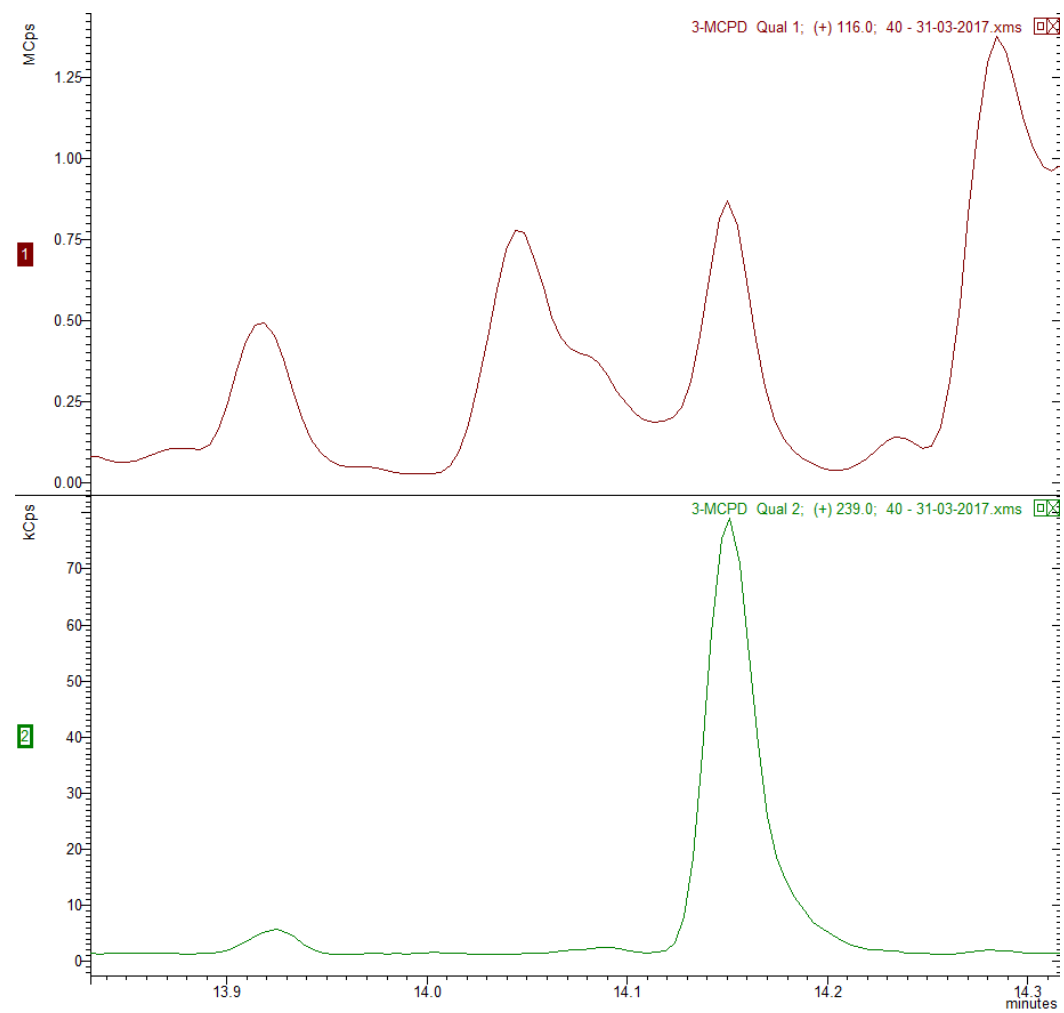


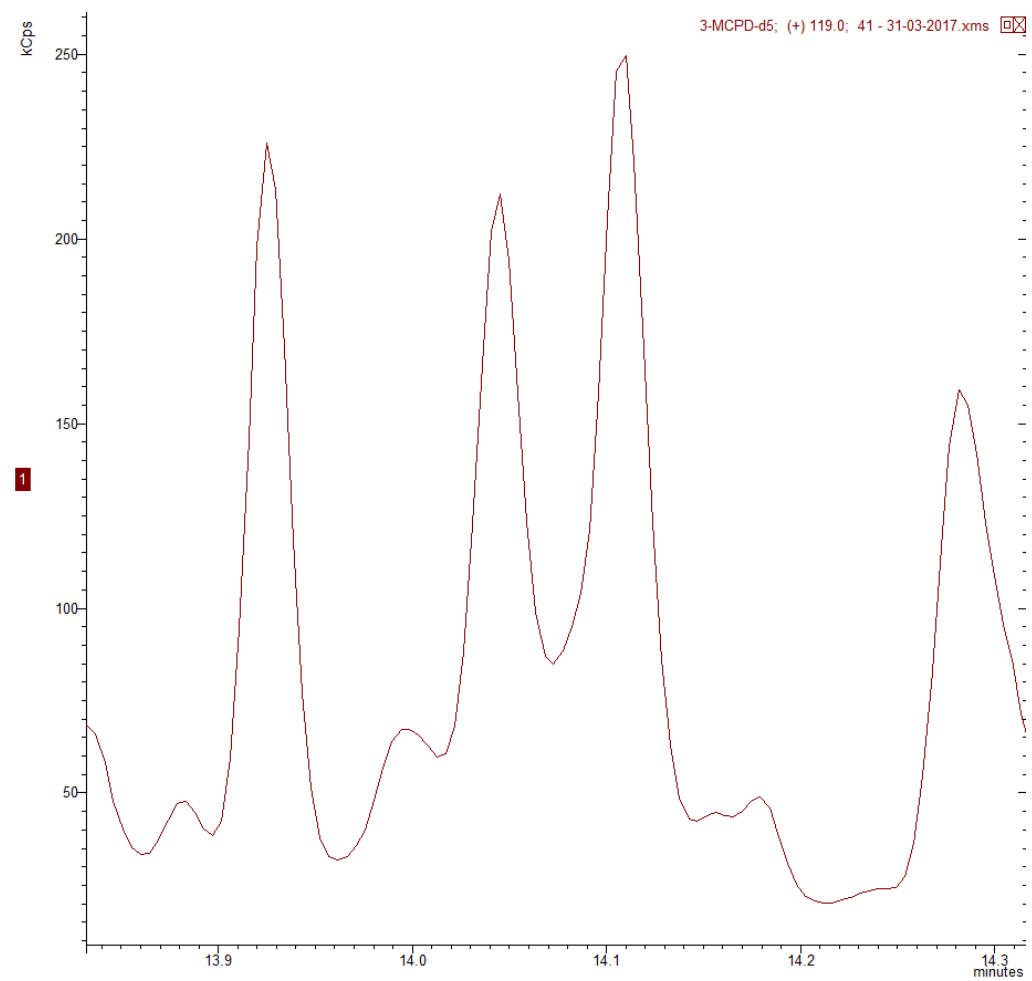
Figura B 141-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem colco mono- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 142-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com água destilada - ião 119**



**Figura B 143-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com água destilada - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**



**Figura B 144-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com mínimo de óleo desmoldante - ião 119**

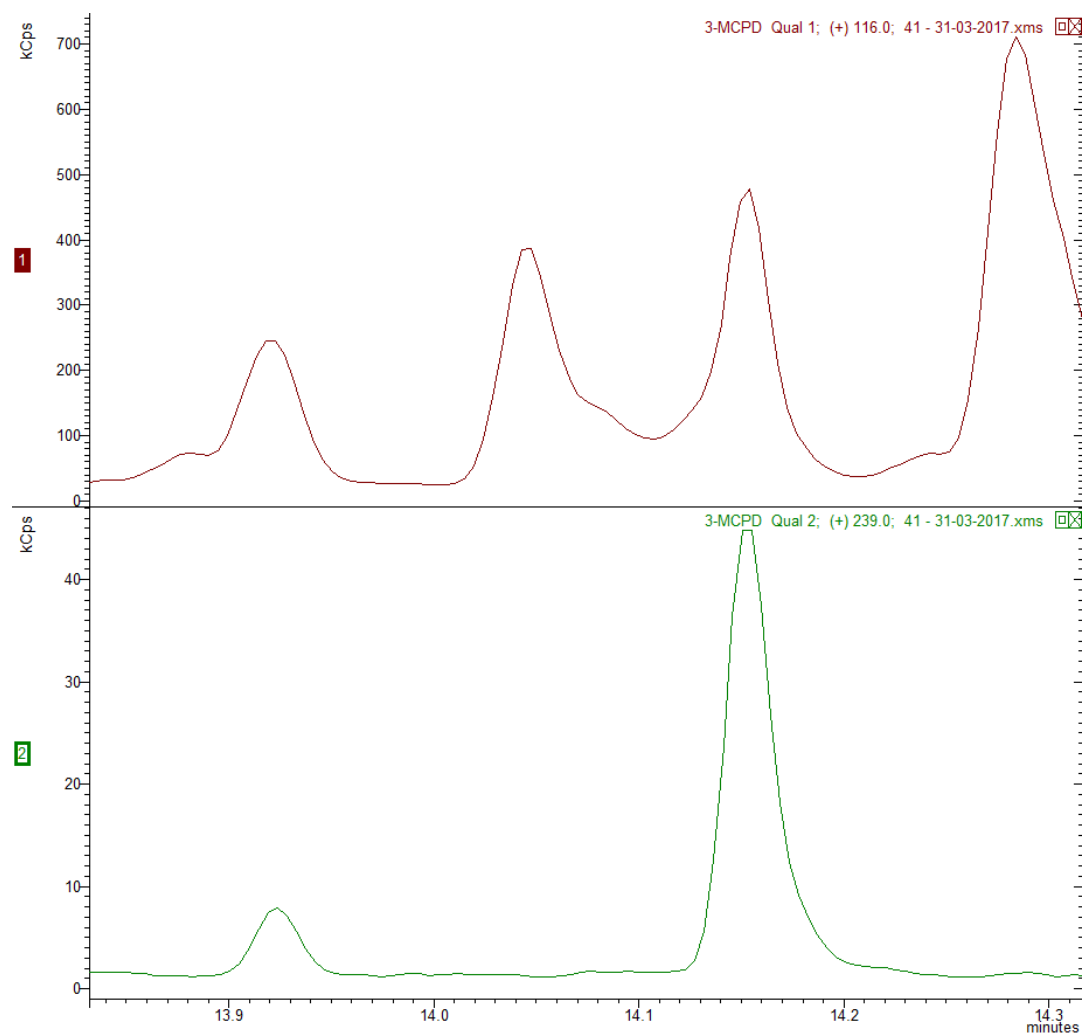
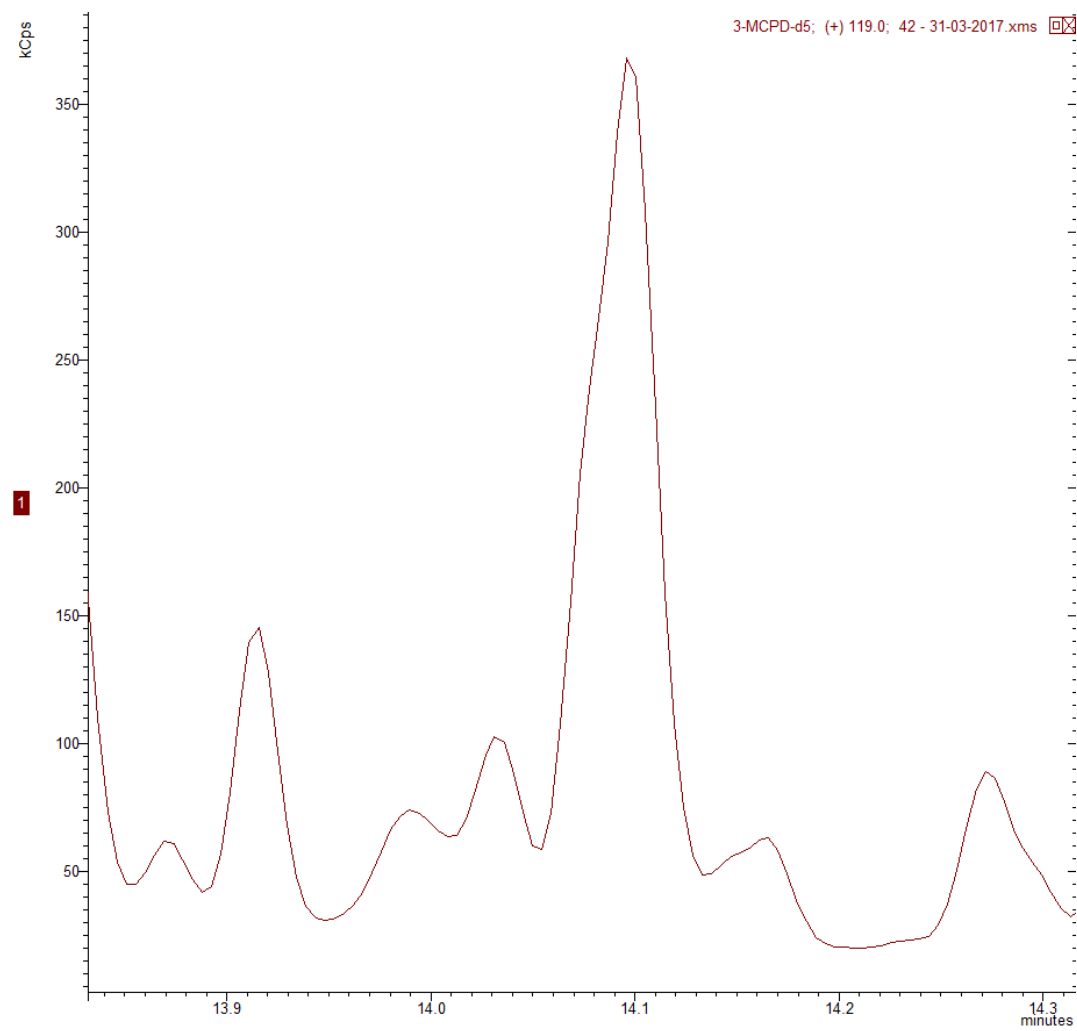


Figura B 145-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com mínimo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 146-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com triplo de óleo desmoldante - ião 119**



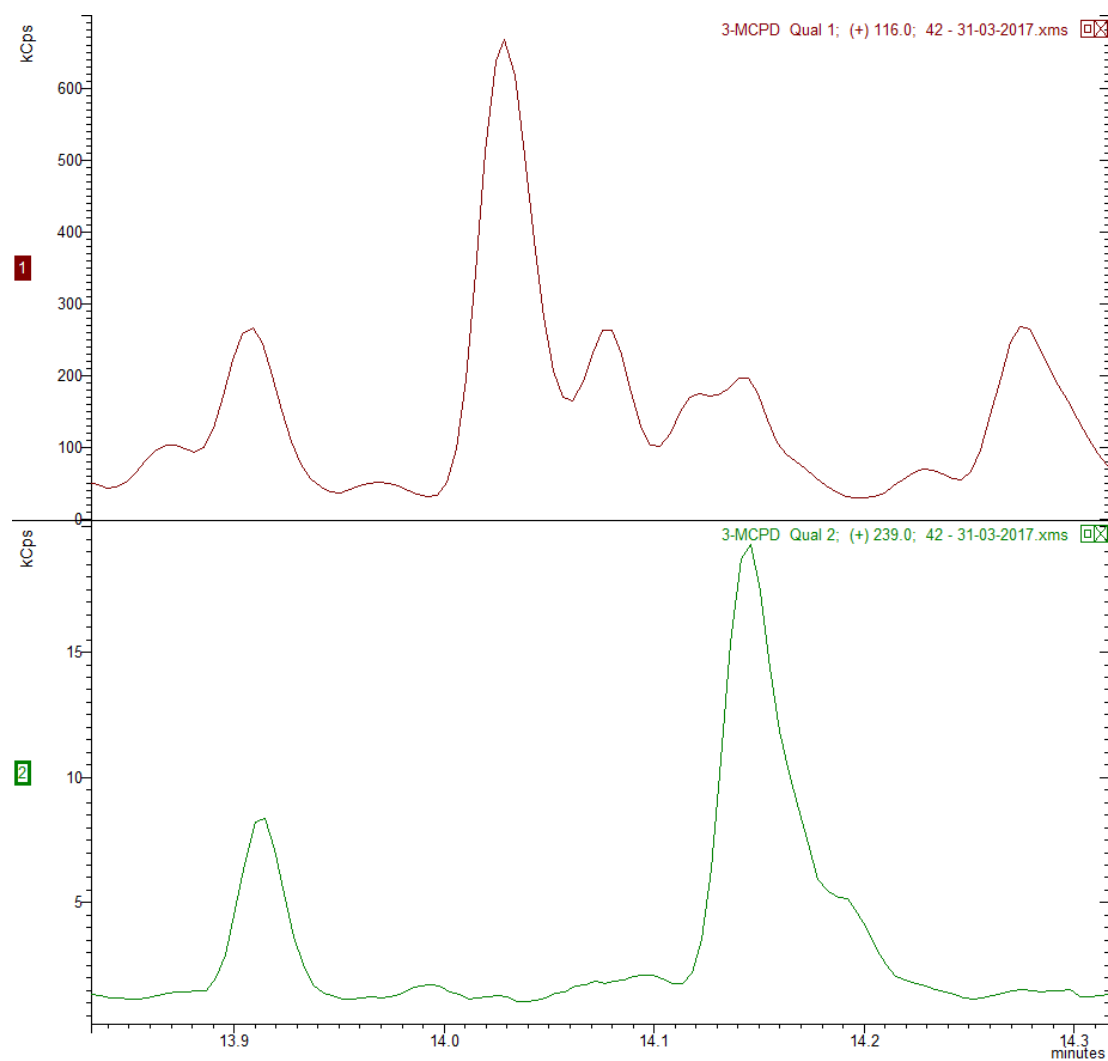
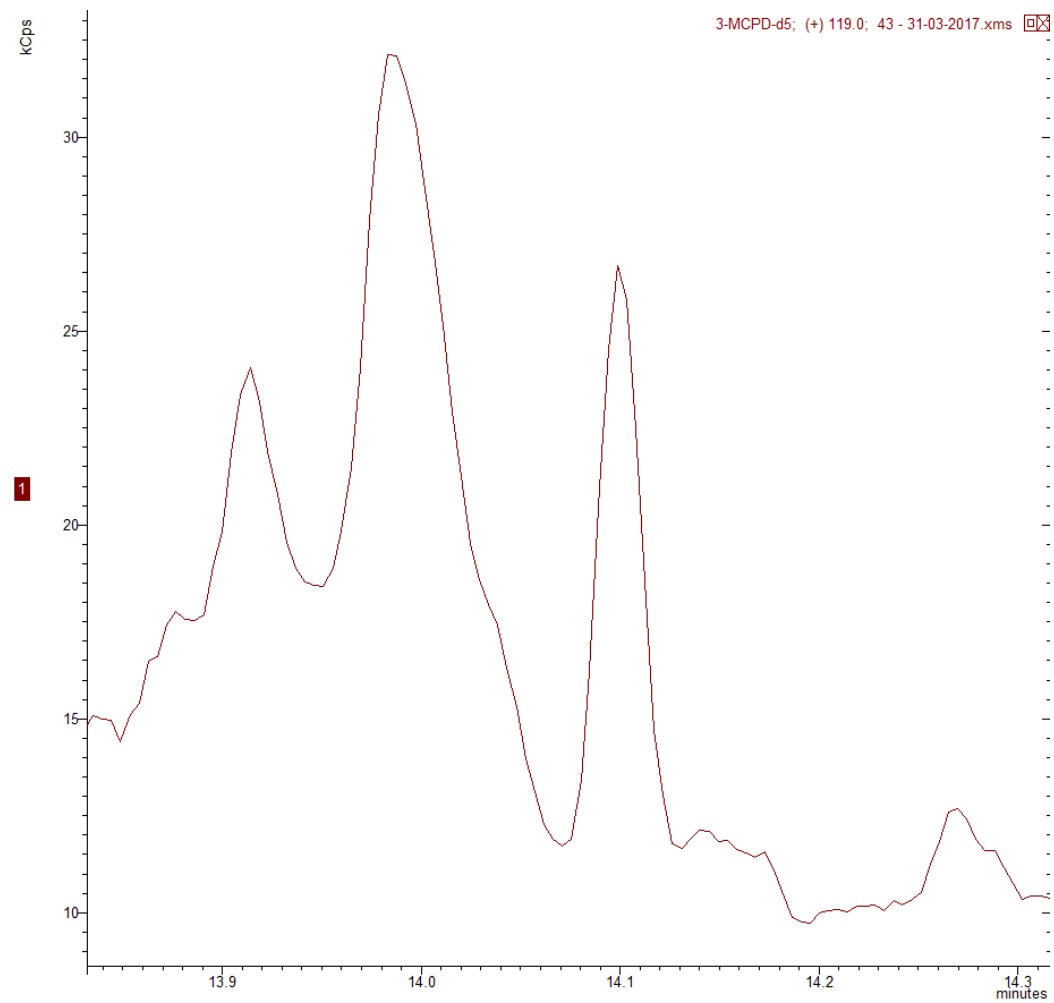


Figura B 147-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore com triplo de óleo desmoldante - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



**Figura B 148-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem glicerina - ião 119**

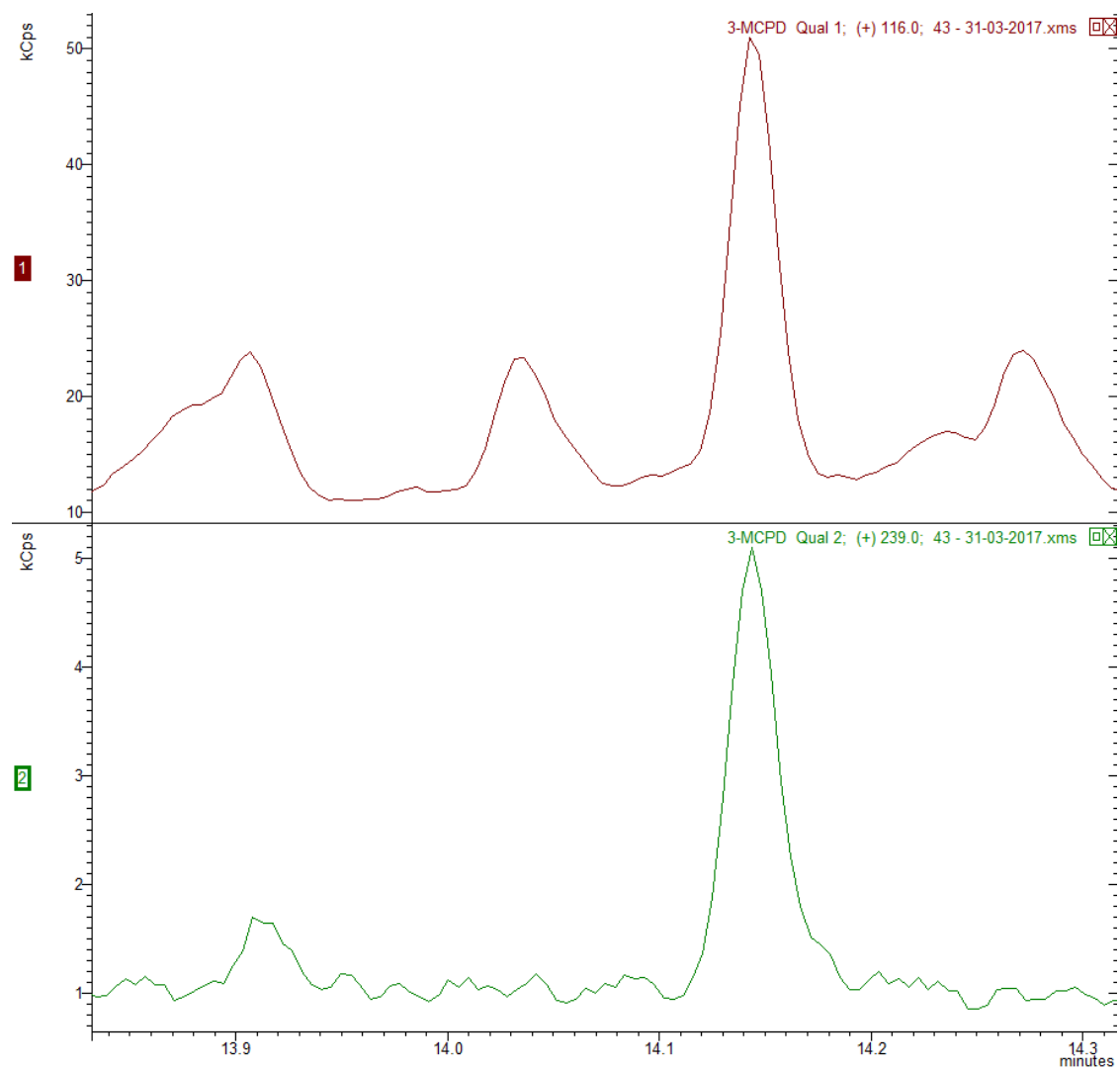
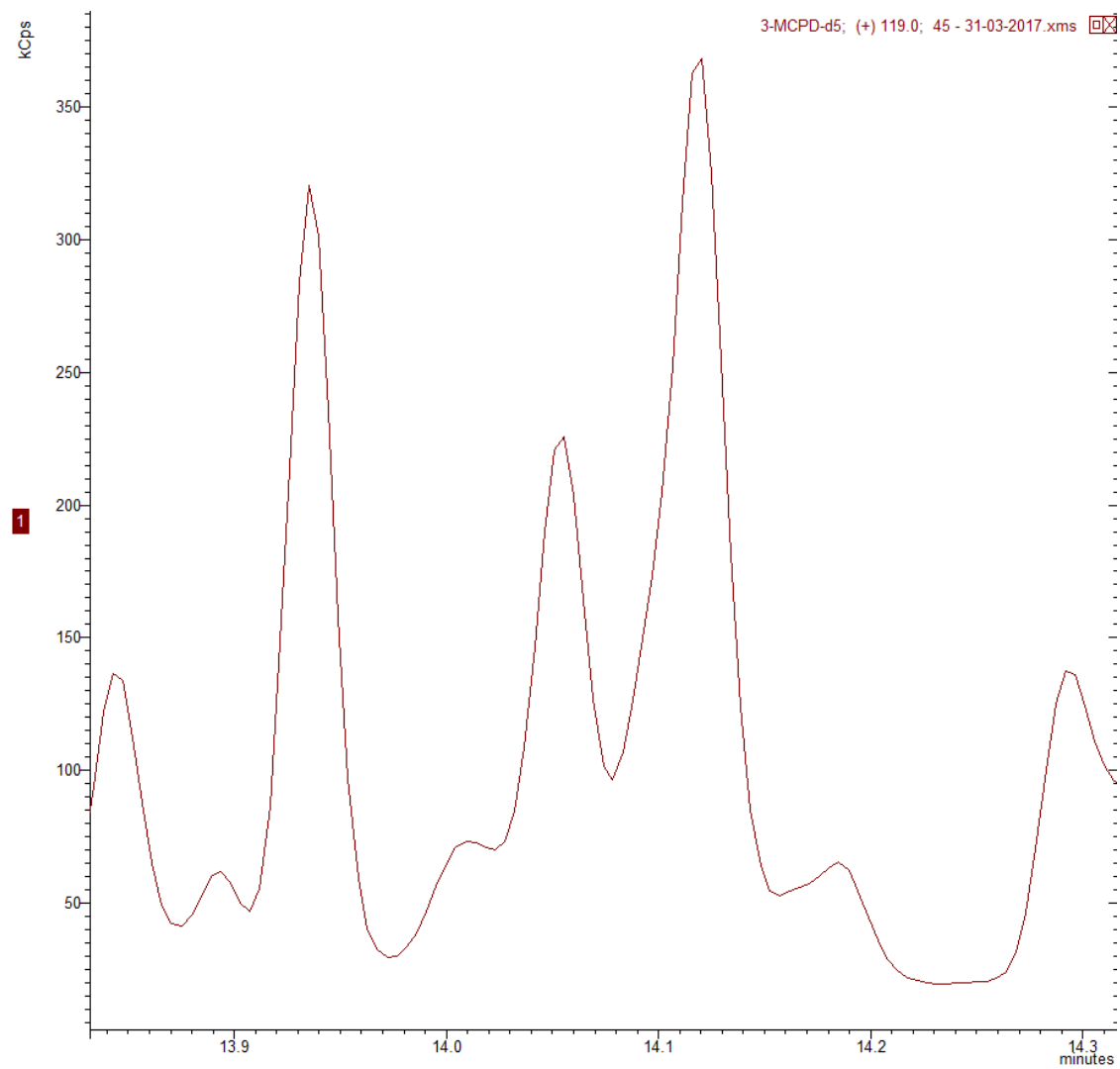
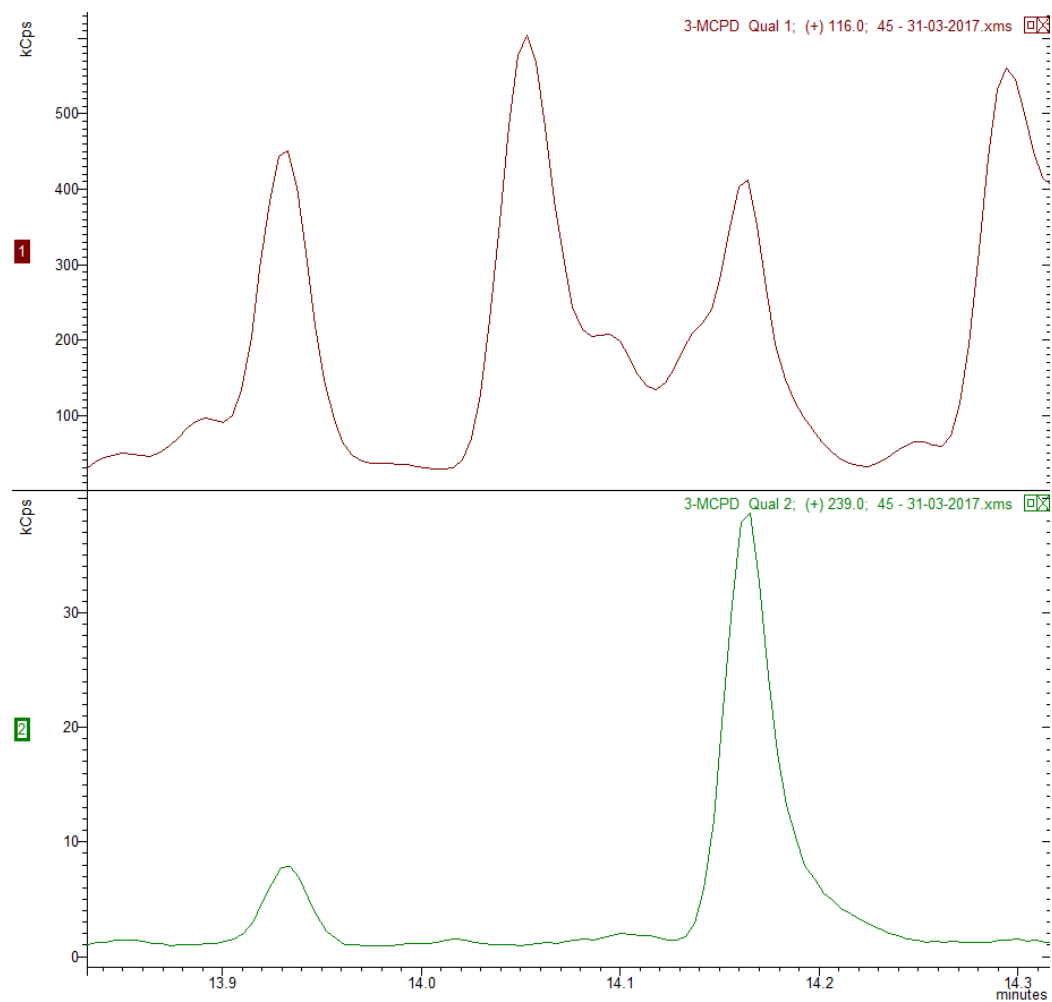


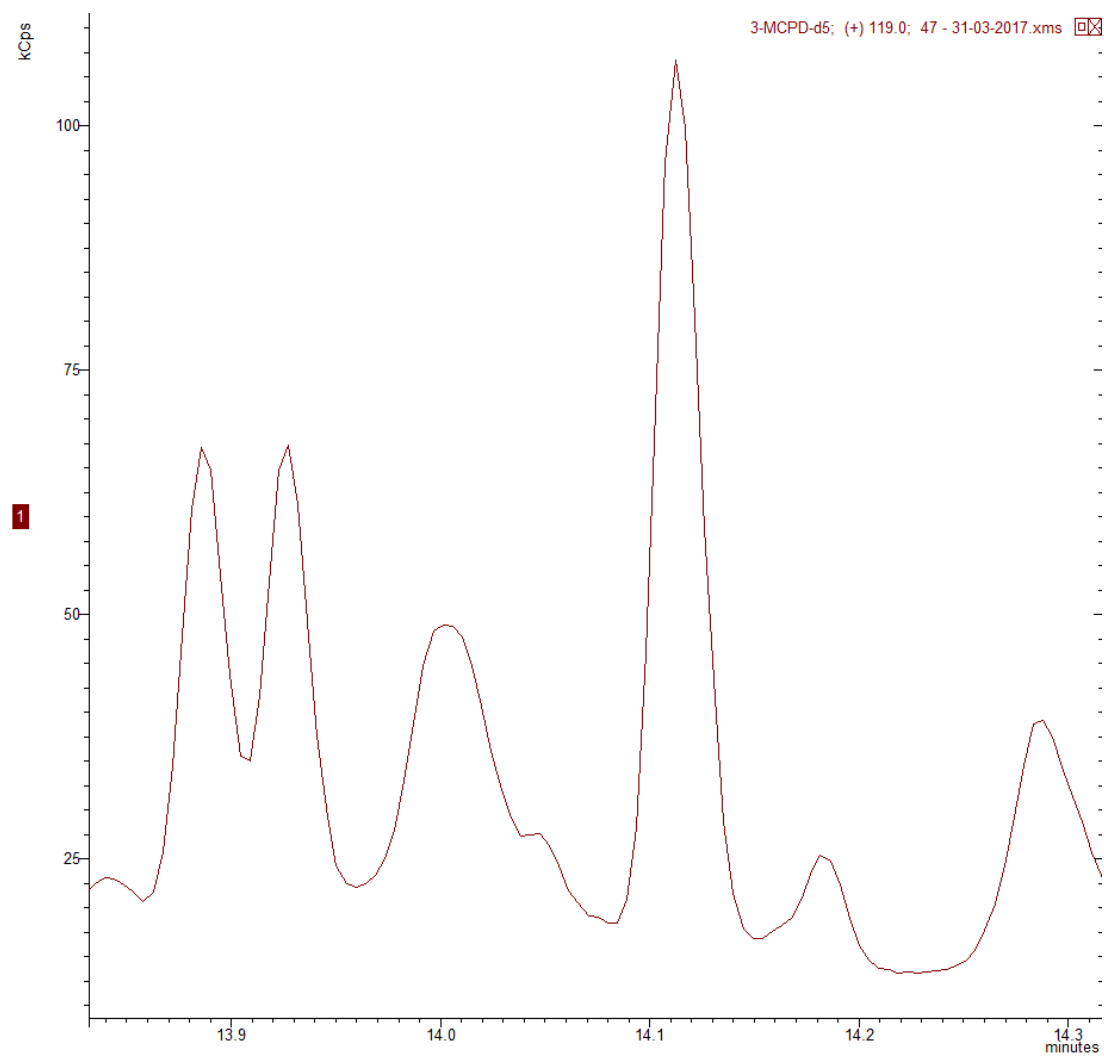
Figura B 149-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore sem glicerina - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239



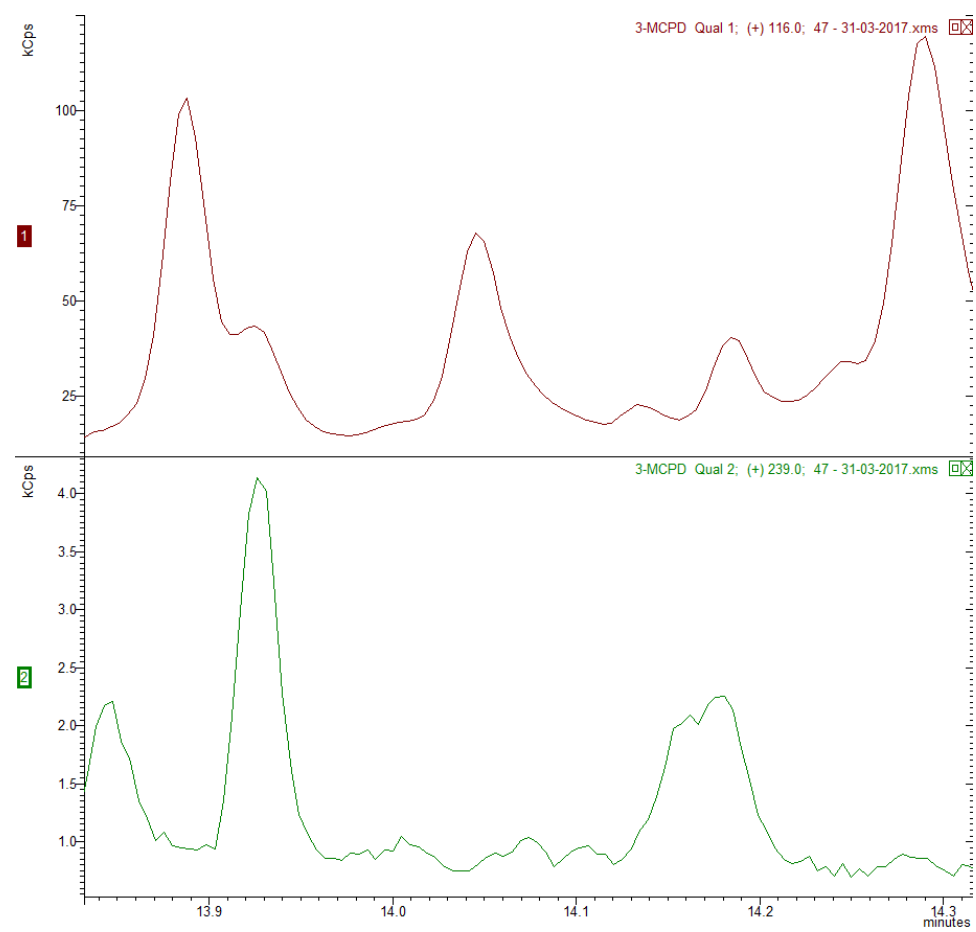
**Figura B 150-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore Starndart - ião 119**



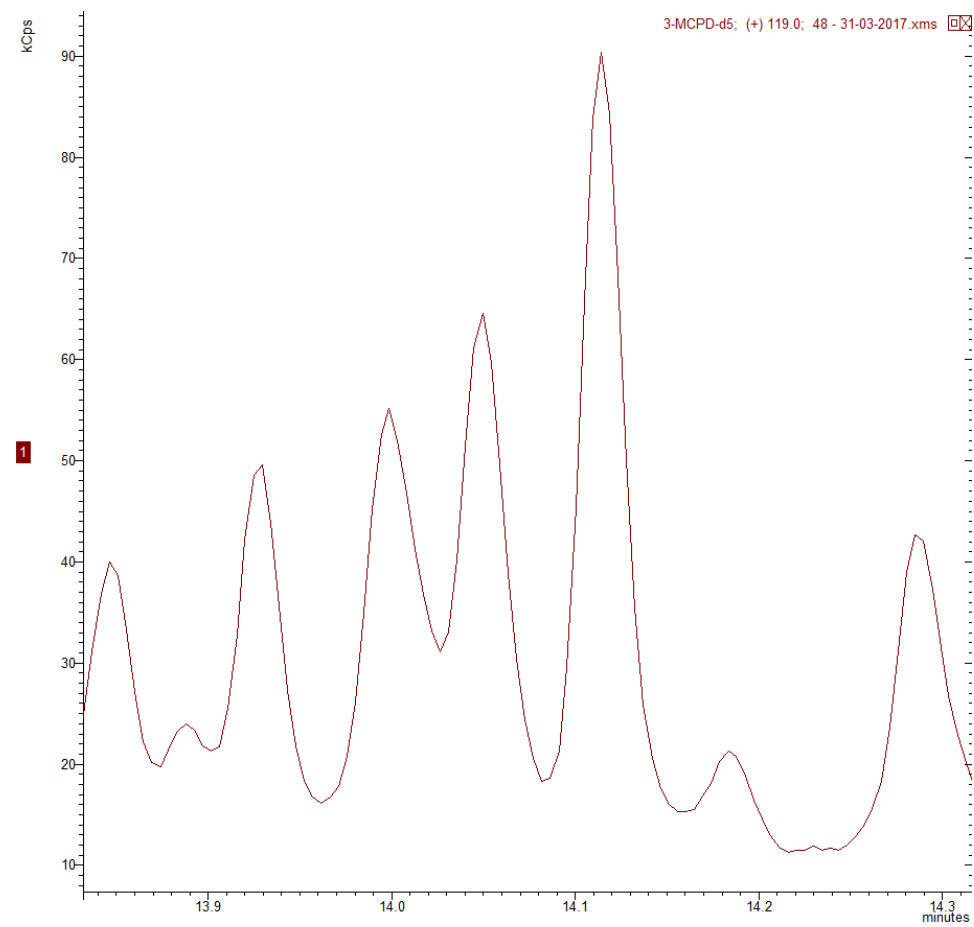
**Figura B 151-Cromatograma TIC de 3-MCPD da receita de Mármore Standart - Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**



**Figura B 152- Cromatograma TIC de 3-MCPD da Água de Lavagem das formas- ião 119**

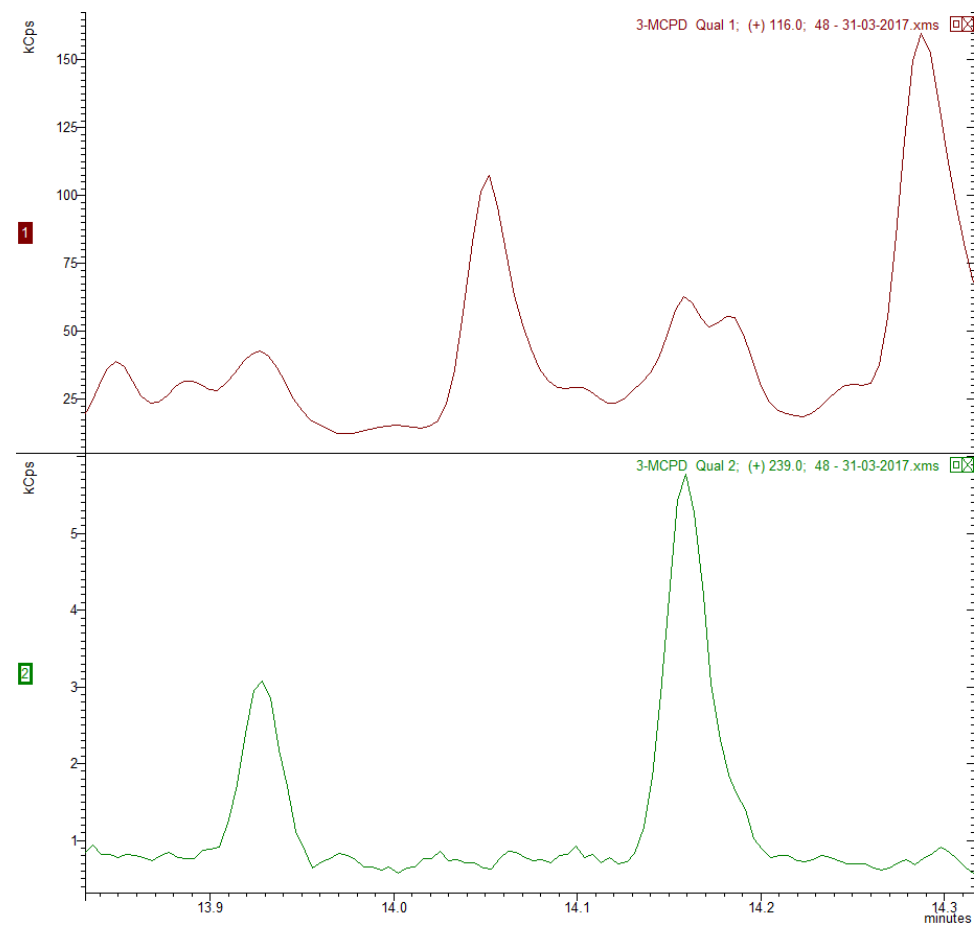


**Figura B 153-Cromatograma TIC de 3-MCPD da água de lavagem das formas- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**

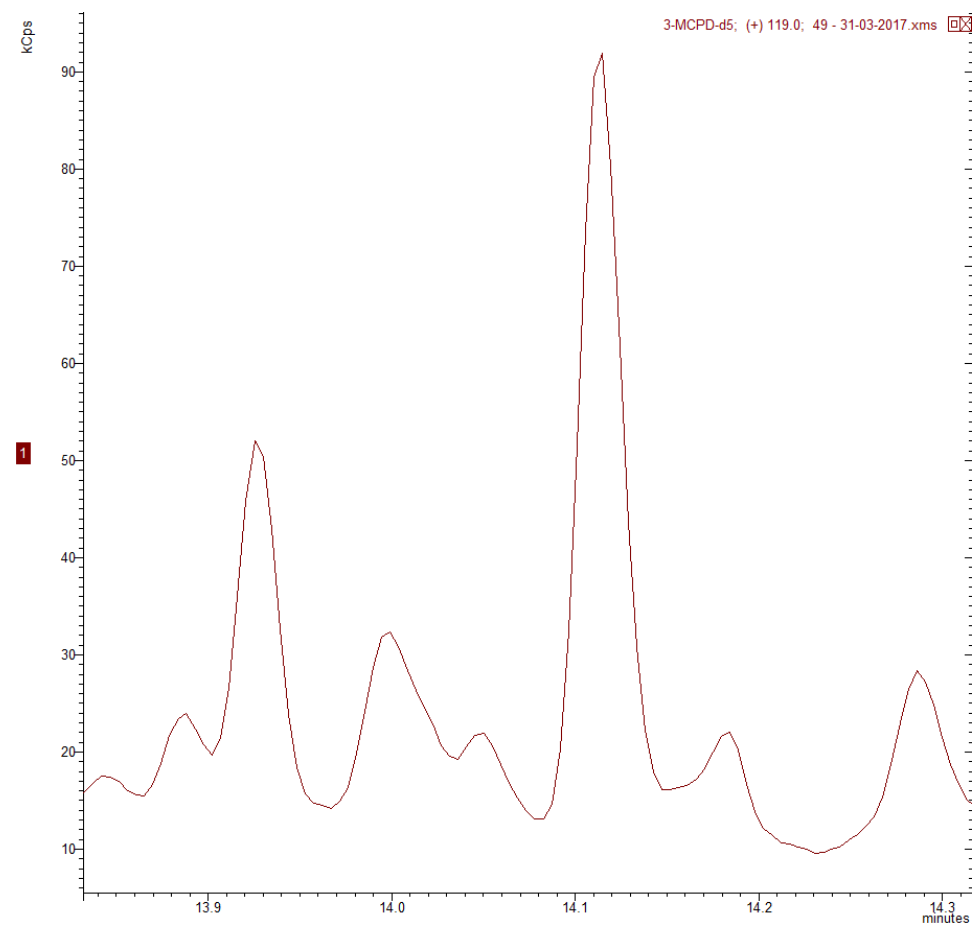


**Figura B 154-Cromatograma TIC de 3-MCPD do Cacao DB11- ião 119**

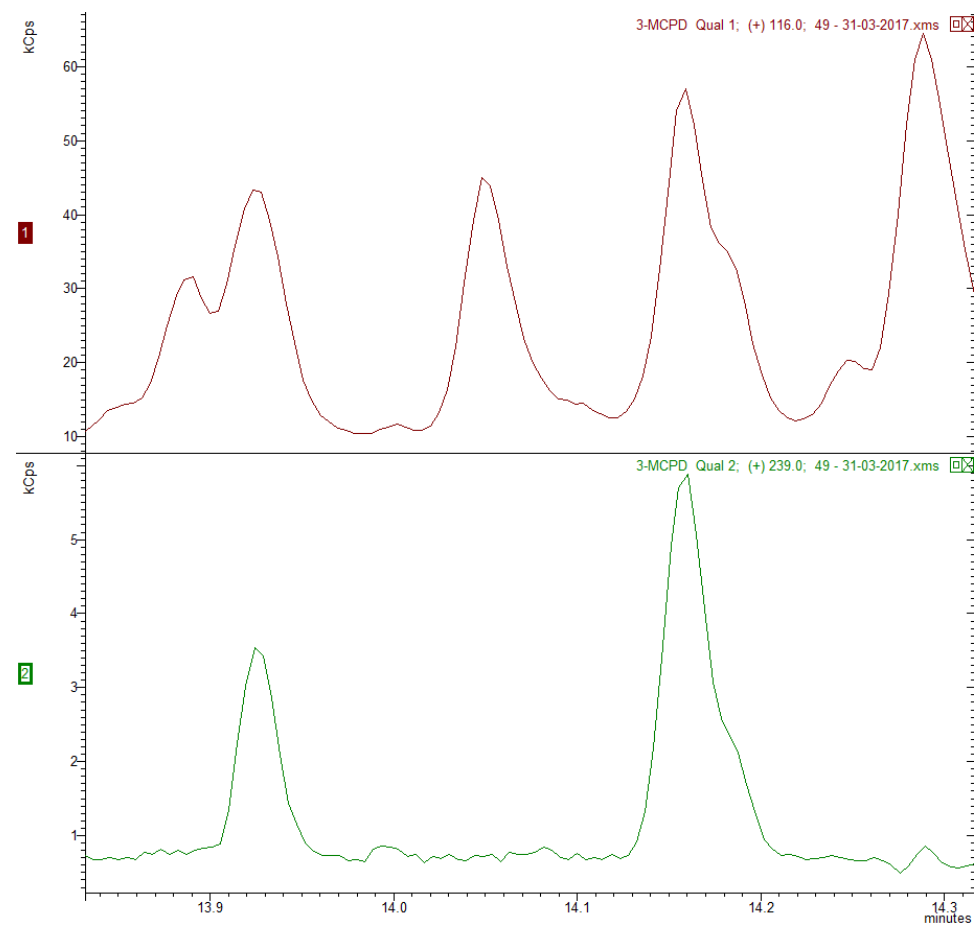




**Figura B 155-Cromatograma TIC de 3-MCPD do Cacau DB11- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**



**Figura B 156-Cromatograma TIC de 3-MCPD da Cobertura de Chocolate- ião 119**



**Figura B 157-Cromatograma TIC de 3-MCPD da Cobertura de Chocolate- Comparação do ião quantifier 116 e do qualifier 239**

C. Outros

	mcpd	dS	ratio m/m	rt		ratio mcpd/dS	y	y com ppb	Y
				14,133	rt 14,1				
recta 1	1	68	0,0147	32145	282614	0,114	0,15419	6,92494	-5,9249
	5	68	0,0735	21624	259072	0,083	0,13401	4,03018	0,96982
	25	68	0,3676	29829	237025	0,126	0,16225	8,08246	16,9175
	50	68	0,7353	398274	824201	0,483	0,40037	42,2538	7,74624
	1	68	0,0147	31022	218335	0,142	0,17307	9,63499	-8,635
recta 2	5	68	0,0735	76987	213242	0,361	0,31896	30,57	-25,57
	25	68	0,3676	80520	162957	0,494	0,40763	43,2954	-18,295
	50	68	0,7353	382931	680019	0,563	0,45361	49,893	0,10704
	150	68	2,2059	382136	339243	1,126	0,82895	103,756	46,2441
	250	68	3,6765	662719	236880	2,798	1,94251	263,557	-13,557
								1,5066	0,04727 LOD
								20,4605	0,15757 LOQ 1 PPB
	100	68	1,4706	33054	215536	0,153			
	200	68	2,9412	80092	223575	0,358			

